



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGÍA

**CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS: EVALUACIÓN
PRONÓSTICA DE VARIABLES CLÍNICAS, HISTOLÓGICAS E
INMUNOHISTOQUÍMICAS**

TESIS DOCTORAL

MÁRCIO DINIZ FREITAS

Santiago de Compostela, Marzo de 2005

DIRECTOR: Prof. Dr. Abel García García

CO-DIRECTORES: Prof. Dr. Tomás García-Caballero Parada

Prof. Dr. José Manuel Gándara Rey

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han prestado su ayuda y colaboración en la realización de la presente tesis, y de forma muy especial:

Al Prof. D. Abel García García, por el impulso para el inicio y continuidad de la investigación, así como por su amistad, confianza y apoyo permanente durante todos esos años.

Al Prof. D. José Manuel Gándara Rey, maestro y amigo, por sus sabios consejos y su estímulo constante a lo largo de la investigación.

Al Prof. D. Tomás García-Caballero Parada, por sus valiosos conocimientos y aportaciones en la investigación y por su desinteresada colaboración y disponibilidad en todo momento.

Al Dr. José Antúnez López por su colaboración en la valoración de las piezas histopatológicas.

A Elena Couso Folgueiras e Inés Fernández Campos, y todo el personal del Servicio de Anatomía Patológica del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela, por su ayuda en el procesado de las muestras y en la obtención de los resultados inmunohistoquímicos.

Al Profesor Xosé Luís Otero Cepeda, por sus orientaciones en el análisis estadístico de los datos.

Al personal del Archivo Central del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela por agilizar el proceso de revisión de las historias clínicas.

I. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	8
II. INTRODUCCIÓN.....	11
II.1. CÁNCER ORAL.....	12
II.1.A. Concepto.....	12
II.1.B. Epidemiología.....	13
II.1.C. Clínica.....	14
II.1.D. Histología	14
II.1.D.a. Frente de Invasión Tumoral.....	15
II.1.D.b. Modo de Invasión Tumoral.....	16
II.1.E. Topografía.....	17
II.1.E.a. Lengua.....	17
II.1.E.b. Suelo de boca.....	17
II.1.E.c. Reborde alveolar.....	18
II.1.E.d. Mucosa yugal.....	18
II.1.E.e. Paladar.....	19
II.1.E.f. Trígono retromolar.....	19
II.1.F. Estadiaje.....	19
II.1.G. Etiopatogenia.....	21
II.1.H. Pronóstico.....	24
II.1.I. Segundos Tumores Primarios y Cancerización de Campo.....	25
II.1.J. Tratamiento.....	28
II.1.J.a. Cirugía.....	29
II.1.J.b. Vaciamiento Ganglionar Cervical.....	30
II.1.J.c. Radioterapia.....	31
II.1.J.d. Quimioterapia.....	32
II.1.J.e. Futuros conceptos en el tratamiento.....	32
II.2. BASES GENÉTICAS DEL CÁNCER ORAL.....	36
II.2.A. Ciclo celular.....	36
II.2.A.a. Regulación del ciclo celular y cáncer oral.....	39
II.2.B. Oncogenes.....	40
II.2.B.a. Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR).....	40
II.2.B.b. Ciclina D1.....	43
II.2.C. Genes supresores de tumores.....	44
II.2.C.a. Gen <i>P53</i>	44
II.2.C.b. Gen <i>P27</i>	46
II.2.D. Proliferación celular.....	47
II.2.D.a. Antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA).....	48
II.2.D.b. Ki-67.....	48

II.2.E. Apoptosis.....	51
II.2.E.a. Bcl-2.....	52
II.2.E.b. Survivina.....	53
II.2.F. Angiogénesis.....	54
II.2.F.a. Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF).....	55
II.2.G. Invasión y metástasis.....	55
II.2.G.a. Laminina 5 γ 2.....	56
II.2.G.b. Cadherina-E.....	58
II.3.EPIGENÉTICA DEL CÁNCER ORAL.....	59
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	61
III.1. SELECCIÓN DE LOS PACIENTES.....	62
III.1.A. Criterios de inclusión y exclusión.....	62
III.2. DATOS CLÍNICOS.....	62
III.2.A. Factores de riesgo.....	63
III.2.A.a. Tabaco.....	63
III.2.A.b. Alcohol.....	63
III.2.B. Evolución de la enfermedad.....	63
III.2.C. Evolución de los pacientes.....	64
III.3. ESTUDIO HISTOLÓGICO CONVENCIONAL.....	64
III.3.A. Grado de diferenciación histológica.....	64
III.3.B. Modo de invasión tumoral.....	64
III.3.C. Profundidad de invasión tumoral.....	65
III.3.D. Invasión perineural.....	65
III.3.E. Estado de los márgenes quirúrgicos.....	65
III.4. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO.....	66
III.4.A. Preparación de los cortes de parafina.....	66
III.4.B. Recuperación antigénica.....	66
III.4.B.a. Ki-67/MIB-1 y Laminina 5 γ 2.....	66
III.4.B.b. EGFR.....	66
III.4.B.c. Cadherina-E.....	66
III.4.C. Técnica inmunohistoquímica.....	67
III.4.D. Valoración de los marcadores inmunohistoquímicos.....	69
III.4.D.a. Cuantificación de la expresión de Ki-67/MIB-1.....	69
III.4.D.b. Cuantificación de la expresión de EGFR.....	70
III.4.D.c. Cuantificación de la expresión de laminina 5 γ 2.....	70
III.4.D.d. Cuantificación de la expresión de cadherina-E.....	71
III.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	71
III.5.a. Representación gráfica de los resultados.....	72

IV. RESULTADOS.....	74
IV.1. SELECCIÓN DE LOS PACIENTES.....	75
IV.2. DATOS CLÍNICOS.....	75
IV.2.A. Edad y sexo.....	75
IV.2.B. Factores de riesgo.....	75
IV.2.B.a. Tabaco.....	75
IV.2.B.b. Alcohol.....	76
IV.2.B. Localización del tumor primario.....	76
IV.2.C. Estadio TNM.....	76
IV.2.C.a. Tamaño del tumor primario.....	76
IV.2.C.b. Ganglios linfáticos cervicales (estadio N).....	77
IV.2.D. Estadio Clínico.....	77
IV.2.E. Tratamiento.....	78
IV.3. EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD.....	79
IV.3.A. Recidivas locales.....	79
IV.3.B. Recidivas regionales.....	79
IV.3.C. Metástasis a distancia y segundos tumores primarios.....	79
IV.4. EVOLUCIÓN DEL PACIENTE.....	79
IV.5. ESTUDIO HISTOLÓGICO.....	80
IV.5.A. Grado de diferenciación histológica.....	80
IV.5.B. Modo de Invasión Tumoral.....	80
IV.5.C. Profundidad de Invasión Tumoral.....	82
IV.5.D. Invasión Perineural.....	83
IV.5.E. Estado de los márgenes quirúrgicos.....	83
IV.6. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO.....	84
IV.6.A. Índice de Proliferación celular (MIB-1).....	84
IV.6.A.a. Correlación entre MIB-1 y Edad.....	86
IV.6.A.b. Correlación entre MIB-1 y Sexo.....	86
IV.6.A.c. Correlación entre MIB-1 y Localización.....	87
IV.6.A.d. Correlación entre MIB-1 y Estadio TNM.....	88
IV.6.A.e. Correlación entre MIB-1 y Estadio clínico.....	89
IV.6.A.f. Correlación entre MIB-1 y Grado de diferenciación histológica.....	90
IV.6.A.g. Correlación entre MIB-1 y Modo de invasión tumoral.....	90
IV.6.A.h. Correlación entre MIB-1 y Profundidad de invasión tumoral.....	91
IV.6.B. Expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR).....	93
IV.6.B.a. Correlación entre EGFR y Edad.....	95
IV.6.B.b. Correlación entre EGFR y Sexo.....	96
IV.6.B.c. Correlación entre EGFR y Localización.....	97
IV.6.B.d. Correlación entre EGFR y Estadio TNM.....	97
IV.6.B.e. Correlación entre EGFR y Estadio clínico.....	98

IV.6.B.f. Correlación entre EGFR y Grado de diferenciación histológica.....	98
IV.6.B.g. Correlación entre EGFR y Modo de invasión tumoral.....	99
IV.6.B.h. Correlación entre EGFR y Profundidad de invasión tumoral.....	99
IV.6. C. Expresión de laminina 5 γ 2.....	100
IV.6.C.a. Correlación entre laminina 5 γ 2 y Edad.....	103
IV.6.C.b. Correlación entre laminina 5 γ 2 y Sexo.....	104
IV.6.C.c. Correlación entre laminina 5 γ 2 y Localización.....	104
IV.6.C.d. Correlación entre laminina 5 γ 2 y Estadío TNM.....	105
IV.6.C.e. Correlación entre laminina 5 γ 2 y Estadío clínico.....	106
IV.6.C.f. Correlación entre laminina 5 γ 2 y Grado de diferenciación histológica.....	106
IV.6.C.g. Correlación entre laminina 5 γ 2 y Modo de invasión tumoral.....	107
IV.6.C.h. Correlación entre laminina 5 γ 2 y Profundidad de invasión tumoral.....	107
IV.6.D. Expresión de cadherina-E.....	108
IV.6.D.a. Correlación entre cadherina-E y Edad.....	110
IV.6.D.b. Correlación entre cadherina-E y Sexo.....	111
IV.6.D.c. Correlación entre cadherina-E y Localización.....	111
IV.6.D.d. Correlación entre cadherina-E y Estadío TNM.....	112
IV.6.D.e. Correlación entre cadherina-E y Estadío clínico.....	113
IV.6.D.f. Correlación entre cadherina-E y Grado de diferenciación histológica.....	113
IV.6.D.g. Correlación entre cadherina-E y Modo de invasión tumoral.....	114
IV.6.D.h. Correlación entre cadherina-E y Profundidad de invasión tumoral.....	114
IV.6.E. Correlación entre marcadores inminohistoquímicos.....	115
IV.6.E.a. Correlación entre Índice de proliferación celular (MIB-1) y EGFR.....	115
IV.6.E.b. Correlación entre Índice de proliferación celular (MIB-1) y Laminina 5 γ 2.....	115
IV.6.E.c. Correlación entre Índice de proliferación celular (MIB-1) y Cadherina-E.....	116
IV.6.E.d. Correlación entre EGFR y Laminina 5 γ 2.....	117
IV.6.E.e. Correlación entre EGFR y Cadherina-E.....	117
IV.6.E.f. Correlación entre laminina 5 γ 2 y Cadherina-E.....	118
IV.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS RECIDIVAS LOCALES.....	118
IV.7.A. Parámetros Clínicos.....	118
IV.7.A.a. Edad.....	118
IV.7.A.b. Sexo.....	119
IV.7.A.c. Localización.....	120
IV.7.A.d. Estadío TNM.....	120
IV.7.A.e. Estadío clínico.....	121
IV.7.A.f. Tratamiento del tumor primario.....	122
IV.7.B. Parámetros Histológicos.....	122
IV.7.B.a. Grado de diferenciación histológica.....	122
IV.7.B.b. Modo de invasión tumoral.....	123
IV.7.B.c. Profundidad de invasión tumoral.....	123

IV.7.B.d. Invasión perineural.....	124
IV.7.B.e. Estado de los márgenes quirúrgicos.....	124
IV.7.C. Parámetros Inmunohistoquímicos.....	125
IV.7.C.a. Índice de proliferación celular (MIB-1).....	125
IV.7.C.b. Expresión de EGFR.....	125
IV.7.C.c. Expresión de laminina 5 γ 2.....	126
IV.7.C.d. Expresión de cadherina-E.....	126
IV.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS RECIDIVAS REGIONALES.....	127
IV.8.A. Parámetros Clínicos.....	127
IV.8.A.a. Edad.....	127
IV.8.A.b. Sexo.....	128
IV.8.A.c. Localización.....	129
IV.8.A.d. Estadío TNM.....	129
IV.8.A.e. Estadío clínico.....	130
IV.8.A.f. Tratamiento del tumor primario.....	131
IV.8.B. Parámetros Histológicos.....	131
IV.8.B.a. Grado de diferenciación histológica.....	131
IV.8.B.b. Modo de invasión tumoral.....	132
IV.8.B.c. Profundidad de invasión tumoral.....	132
IV.8.B.d. Invasión perineural.....	133
IV.8.B.e. Estado de los márgenes quirúrgicos.....	133
IV.8.C. Parámetros Inmunohistoquímicos.....	134
IV.8.C.a. Índice de proliferación celular (MIB-1).....	134
IV.8.C.b. Expresión de EGFR.....	134
IV.8.C.c. Expresión de laminina 5 γ 2.....	135
IV.8.C.d. Expresión de cadherina-E.....	135
IV.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL INTERVALO LIBRE DE ENFERMEDAD.....	136
IV.9.A. Parámetros Clínicos.....	136
IV.9.A.a. Edad.....	136
IV.9.A.b. Sexo.....	137
IV.9.A.c. Localización.....	138
IV.9.A.d. Estadío TNM.....	138
IV.9.A.e. Estadío clínico.....	140
IV.9.A.f. Tratamiento del tumor primario.....	140
IV.9.B. Parámetros Histológicos.....	141
IV.9.B.a. Grado de diferenciación histológica.....	141
IV.9.B.b. Modo de invasión tumoral.....	142
IV.9.B.c. Profundidad de invasión tumoral.....	142
IV.9.B.d. Invasión perineural.....	142
IV.9.B.e. Estado de los márgenes quirúrgicos.....	143

IV.9.C. Parámetros Inmunohistoquímicos.....	144
IV.9.C.a. Índice de proliferación celular (MIB-1).....	144
IV.9.C.b. Expresión de EGFR.....	144
IV.9.C.c. Expresión de laminina 5 γ 2.....	144
IV.9.C.d. Expresión de cadherina-E.....	145
IV.9.D. Análisis multivariante del intervalo libre de enfermedad.....	148
IV.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA SUPERVIVENCIA.....	149
IV.10.A. Parámetros Clínicos.....	149
IV.10.A.a. Edad.....	149
IV.10.A.b. Sexo.....	150
IV.10.A.c. Localización.....	151
IV.10.A.d. Estadio TNM.....	151
IV.10.A.e. Estadio clínico.....	153
IV.10.A.f. Tratamiento del tumor primario.....	153
IV.10.B. Parámetros Histológicos.....	154
IV.10.B.a. Grado de diferenciación histológica.....	154
IV.10.B.b. Modo de invasión tumoral.....	155
IV.10.B.c. Profundidad de invasión tumoral.....	155
IV.10.B.d. Invasión perineural.....	156
IV.10.B.e. Estado de los márgenes quirúrgicos.....	157
IV.10.C. Parámetros Inmunohistoquímicos.....	157
IV.10.C.a. Índice de proliferación celular (MIB-1).....	157
IV.10.C.b. Expresión de EGFR.....	157
IV.10.C.c. Expresión de laminina 5 γ 2.....	158
IV.10.C.d. Expresión de cadherina-E.....	159
IV.10.D. Análisis multivariante de la supervivencia.....	162
V. DISCUSIÓN.....	163
V.1. CONSIDERACIONES SOBRE LA MUESTRA DE PACIENTES ESTUDIADA.....	164
V.2. CONSIDERACIONES SOBRE LOS PARÁMETROS CLÍNICOS.....	165
V.3. CONSIDERACIONES SOBRE LOS PARÁMETROS HISTOLÓGICOS.....	168
V.3.A. Grado de diferenciación histológica.....	168
V.3.B. Modo de invasión tumoral.....	169
V.3.C. Profundidad de invasión tumoral.....	170
V.3.D. Invasión perineural.....	172
V.3.E. Estado de los márgenes quirúrgicos.....	172
V.4. CONSIDERACIONES SOBRE LOS PARÁMETROS INMUNOHISTOQUÍMICOS.....	173
V.4.A. Índice de proliferación celular.....	173
V.4.B. Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR).....	177
V.4.C. Laminina 5 γ 2.....	180

V.4.D. Cadherina-E.....	182
VI. CONCLUSIONES.....	186
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	189
A. PÉNDICE.....	225
A1. HOJA DE RECOGIDA DE DATOS CLÍNICOS.....	226

I. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Anualmente, más de 300.000 nuevos casos de carcinoma oral de células escamosas (CCEO) son diagnosticados en todo el mundo.¹ De estos, aproximadamente 50.000 casos ocurren en Estados Unidos y Europa.² En España, la incidencia del cáncer oral es de 12 a 15 casos/100.000 habitantes/año en varones y de 2 a 4 casos/100.000 habitantes/año en mujeres, y representa entre el 2 y el 3% de todas las muertes por cáncer en nuestro país.³ Además, estudios epidemiológicos recientes⁴ han demostrado un aumento de la mortalidad anual por cáncer oral, de un 25% para los hombres y de un 9% para las mujeres, durante el período de 1975- 1994, lo que hace que el cáncer oral deba ser considerado un problema de salud pública en España.⁵

La estimación del pronóstico del paciente es de gran importancia para seleccionar una terapia individual para cada uno de los pacientes y con eso mejorar el pronóstico de esta enfermedad.²

A pesar de la intensa investigación en el campo de las modalidades de tratamiento del cáncer oral, la tasa de supervivencia a los 5 años no ha mejorado en las últimas décadas. Una de las razones es que la piedra angular de las decisiones terapéuticas, el sistema de clasificación TNM, complementada con el estadio del grado de diferenciación histológica, ha demostrado no ser siempre un indicador pronóstico satisfactorio. Por lo tanto, hay una acuciante necesidad de investigación de nuevos indicadores pronósticos, a fin de valorar la agresividad biológica de las lesiones propias de cada paciente.

En las últimas décadas, la identificación de marcadores tumorales en el CCEO con el objetivo de predecir su comportamiento y evolución clínica ha recibido un especial interés. Ciertamente, el conocimiento de los distintos mecanismos biológicos que participan en la carcinogénesis, como la proliferación y crecimiento celular y la capacidad de invasión del tumor puedan servir como métodos diagnósticos auxiliares y de base para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

Por todo lo expuesto, el presente estudio se propone estudiar retrospectivamente una muestra de pacientes con CCEO con los siguientes objetivos:

1-Analizar las características clínico-patológicas del carcinoma oral de células escamosas.

2- Determinar el índice de proliferación celular de dichos tumores, detectando el antígeno de proliferación celular Ki-67 mediante el empleo del anticuerpo monoclonal MIB-1, y relacionarlo con los distintos parámetros clínicos e histológicos obtenidos

3- Valorar mediante inmunohistoquímica la expresión de los marcadores laminina 5 γ 2, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y cadherina-E en dichos tumores y relacionarlos con los distintos parámetros clínicos e histológicos obtenidos.

4- Estudiar la influencia de estos parámetros clínico-patológicos e inmunohistoquímicos en la evolución clínica y pronóstico de los pacientes.

II. INTRODUCCIÓN

II.1. CÁNCER ORAL

II.1.A Concepto

La definición del término “cáncer oral” representa un desafío tanto para los clínicos como para los investigadores. Al contrario que otras áreas del cuerpo, los límites de la cavidad oral no siempre son fáciles de definir. Como consecuencia, la definición exacta del “cáncer oral” respecto a su localización, ha demostrado ser una tarea extremadamente difícil.

Frecuentemente una variedad de tumores heterogéneos es agrupada dentro del término cáncer oral. En la mayoría de los trabajos, los tumores de labios y glándulas salivales son excluidos debido a su distinta estructura histológica, y a la exposición del labio al sol, aunque esta situación no ocurre en todos los estudios. En otros trabajos, el cáncer de orofaringe es estudiado conjuntamente con los cánceres de localización intraoral.

Varios autores,^{6,7,8} han enfatizado la importancia de definir precisamente la expresión “cáncer oral”, al apreciar la diversidad en términos y definiciones utilizados en libros de texto y artículos científicos.

Siguiendo la última edición de la Clasificación Internacional de Enfermedades (ICD) de la Organización Mundial de la Salud (OMS), Moore et al.⁷ sugieren que las lesiones asentadas en la porción móvil de la lengua, suelo de boca, mucosa yugal, mucosa del reborde alveolar superior e inferior y paladar deben ser agrupadas bajo la denominación de cáncer oral, y que el cáncer de labio, orofaringe y de glándulas salivales deben ser analizados separadamente.

Según el origen histológico, el carcinoma de células escamosas representa entre un 90 y un 95% de todas las lesiones malignas de la cavidad oral,⁹ y en el presente trabajo será considerado como sinónimo de cáncer oral.

II.1.B Epidemiología

El cáncer oral constituye un grave problema sanitario en muchos países. No sólo genera una mortalidad significativa, sino también provoca desfiguración extensa, pérdida de función, cambios conductuales y problemas económicos y sociológicos.

La OMS predice un aumento continuo de esta enfermedad en todo el mundo.^{10, 11} El cáncer oral es el undécimo cáncer más común, y representa aproximadamente el 4% de todos los cánceres y un 2% de las muertes por cáncer en el mundo.^{1,12} Estudios epidemiológicos han mostrado que la incidencia del cáncer oral varía significativamente entre zonas geográficas distintas, y entre países desarrollados y en vía de desarrollo. Aunque el carcinoma de células escamosas de la cavidad oral represente menos de 5% de los tumores malignos en los países desarrollados, en India y en el Sudeste de Asia es la neoplasia más frecuente, representando entre un 20 y un 50% de todas ellas.^{13, 14}

En Estados Unidos (EUA) la predicción en relación al cáncer oral y orofaríngeo es de aproximadamente 30.200 nuevos casos al año (20.200 en varones y 10.000 en mujeres), lo que representa un 3% de todos los cánceres en hombres y un 2% en mujeres, permaneciendo estas estadísticas estables durante muchos años.^{15, 16}

En España, la incidencia del cáncer oral varía entre 12 y 15 casos por 100.000 habitantes/año en los varones y entre 2 y 4 casos por 100.000 habitantes/año en el sexo femenino.³

En Brasil, la estimación del Instituto Nacional del Cáncer para el año de 2005 es de aproximadamente 13.880 nuevos casos de cáncer oral, con una tasa de 10,99 casos de cáncer por 100.000 habitantes/año en varones y 4,18 casos por 100.000 habitantes/año en el sexo femenino.¹⁷

La relación varón/mujer también varía en las distintas series mundiales entre 1,2-3,8:1. Sin embargo, esta proporción está modificándose en los últimos años, existiendo una tendencia hacia el equilibrio intersexual justificado por el mayor consumo de tabaco y alcohol por parte de las mujeres.¹⁸ Además, la relación entre

ambos sexos varía según las distintas localizaciones en la cavidad oral. Por ejemplo, el carcinoma de encía o reborde alveolar es más frecuente en mujeres.¹⁹

Más del 90% de los pacientes con cáncer oral son mayores de 45 años, siendo la edad media de presentación alrededor de los 60 años.²⁰ Entre el 1 y el 3% de todos los carcinomas de células escamosas aparecen en pacientes menores de 40 años.^{21,22}

II.1.C. Clínica

Clínicamente, el CCEO se presenta, en estadios precoces, con un aspecto variado, asemejándose a una leucoplasia, eritroplasia o eritroleucoplasia. Con la evolución de la lesión, ésta tiende a ulcerarse, presentando un carácter infiltrativo que resulta en una lesión mal delimitada, endurecida y de superficie granulosa. En algunas ocasiones la lesión puede presentar un carácter exofítico.²³ Bagán et al.²⁴ encontraron que el 19,6% de los pacientes con CCEO presentaban una leucoplasia asociada a la lesión primaria en el momento del diagnóstico. La presencia de leucoplasia asociada al tumor primario se correlacionó con tumores en estadios más tempranos.

II.1.D. Histología

Histológicamente el CCEO se caracteriza por presentar islotes y/o cordones invasivos de células epiteliales malignas similares a las células de la capa espinosa. Las células neoplásicas presentan, en general, citoplasma eosinófilo abundante con núcleos grandes y un aumento de la relación núcleo-citoplasmática.²³ Frecuentemente, se observan grados variados de pleomorfismo celular y nuclear.

Existen distintas variantes en cuanto al grado de diferenciación, que dependen de la similitud que presente el tumor con la arquitectura normal del epitelio. Los carcinomas que producen cantidades importantes de queratina y muestran algún signo de maduración desde la capa basal hacia los estratos superficiales, se denominan bien diferenciados. Los que no producen queratina, pero es posible reconocer cierto grado de estratificación, a pesar de su desviación de la estructura normal, se denominan moderadamente diferenciados. Cuando no producen queratina, su aspecto apenas

muestra semejanza con una estructura epitelial y presentan anomalías celulares frecuentes, se denominan pobremente diferenciados.^{25, 26}

El grado histológico del tumor se relaciona con su comportamiento biológico. Tumores bien diferenciados suelen presentar un crecimiento más lento y producir metástasis en estadios más tardíos. En contraste, los tumores pobremente diferenciados suelen crecer más rápidamente y producir metástasis en estadios precoces. Sin embargo, el proceso de estadiaje histológico del CCEO no deja de ser un proceso subjetivo que depende de los criterios individuales del examinador. El estadiaje clínico parece relacionarse más adecuadamente al pronóstico en la mayoría de los casos.

El diagnóstico histológico del CCEO casi siempre se realiza mediante la microscopía óptica convencional, aunque la aplicación de la inmunohistoquímica mediante marcadores para citoqueratinas puede ser útil en distinguir tumores pobremente diferenciados o indiferenciados de otras lesiones malignas.²³

Una forma especial de CCEO es el carcinoma verrucoso, que se caracteriza desde el punto de vista histológico por su amplia base de implantación y por la formación papilar. Suelen observarse criptas profundas que contienen tapones de queratina entre las proyecciones superficiales alargadas. El epitelio es displásico, pero muestra en raras ocasiones rasgos displásicos intensos. La membrana basal permanece intacta y a menudo existe un infiltrado de células inflamatorias crónicas en el tejido conjuntivo subyacente. La interfase entre el tumor y el epitelio normal adyacente está generalmente bien definida con invasión mínima, si existe, de las células epiteliales a lo largo de un ancho y romo frente de avance de las crestas epiteliales en forma de bulbo.²⁷

II.1.D.a. Frente de invasión tumoral

Los patólogos han observado durante décadas que las células tumorales en las zonas más invasivas de los tumores malignos difieren sustancialmente de las células de las zonas centrales y de la superficie. Basándose en estos hallazgos, Bryne et al.,²⁸ en 1992, publicaron un nuevo enfoque a la hora de clasificar histológicamente los CCEO, examinando solamente las capas celulares que invaden en profundidad y la interfase de defensa del huésped. Esta zona del tumor fue denominada como frente de invasión

tumoral. Este acercamiento, el cual es una modificación y simplificación del sistema multifactorial propuesto por Anneroth et al.,²⁹ permite una información altamente significativa e independiente en pacientes con el mismo estadio TNM. El sistema de estadiaje del frente de invasión tumoral en el CCEO se basa en la valoración cualitativa de parámetros histológicos como el grado de queratinización, polimorfismo nuclear, patrón de invasión e infiltrado linfocitario. El significado pronóstico de la valoración del frente de invasión tumoral ha sido confirmado en diversos estudios sobre carcinomas de cabeza y cuello.^{30,31}

II.1.D.b. Modo de invasión tumoral

El modo de invasión tumoral, uno de los parámetros en común de las distintas clasificaciones del frente de invasión tumoral, ha mostrado ser uno de los parámetros más importantes a la hora de predecir la evolución y pronóstico del CCEO. Aunque las escalas adoptadas para clasificar el modo de invasión presenten diferencias, éstas suelen coincidir en que a medida que la disociación celular aumenta, y el tumor adquiere un patrón más invasivo, el comportamiento clínico de la lesión es más agresivo, con un mayor número de recidivas locales, regionales y un peor pronóstico.

Spiro et al.³², sugirieron una simplificación de la clasificación del frente de invasión tumoral propuesta por Bryne et al.²⁸ (Tabla 1)

-
- A Tumor con márgenes bien delimitados que empujan el tejido adyacente.
 - B Tumor con márgenes que infiltran el tejido adyacente en cordones sólidos.
 - C Tumor con márgenes que contienen pequeños grupos o cordones de células infiltrantes (>15 células tumorales).
 - D Tumores con marcada disociación celular en pequeños grupos celulares o incluso células individuales (<15 células tumorales).
-

Tabla 1. Clasificación del modo de invasión tumoral

II.1.E. Topografía

En cuanto a su localización, si no se considera el cáncer de labio inferior, son la lengua y el suelo de boca las regiones donde con más frecuencia se asientan las lesiones de carcinoma de células escamosas, seguidos por las mucosas yugal y gingival y paladar blando.³³ Según la localización intraoral de la lesión primaria, el CCEO puede presentar características distintas.

II.1.E.a. Lengua

Las superficies póstero-laterales y la cara ventral de la lengua representan casi la totalidad de los CCEO localizados en la lengua. El dorso de la lengua representa una pequeña fracción de estas lesiones y suele asociarse a una lesión crónica de liquen plano oral erosivo, lesiones de sífilis terciaria y lesiones asociadas a la exposición crónica al arsénico. La porción no oral u orofaríngea de la lengua, cuando está afectada por un CCEO, suele dar lugar a síntomas similares a los de una faringitis con distintos grados de disfagia u odinofagia. Ocasionalmente, la metástasis en los ganglios linfáticos regionales puede ser el único o el primer signo de una lesión primaria en base de lengua. La mayoría de los CCE de lengua suelen presentarse como lesiones de 2 ó más centímetros de diámetro.³⁴ El 40% de los casos presentan metástasis linfáticas cervicales en el momento del diagnóstico.

II.1.E.b. Suelo de boca

El carcinoma de suelo de boca representa aproximadamente 1/3 de todos los carcinomas orales, y se ha notado un aumento en la frecuencia de carcinomas en esta localización en mujeres. La existencia de lesiones precursoras, leucoplasia o eritroplasia, es frecuente en esta localización. La porción anterior del suelo de boca en las proximidades del frenillo lingual y de los ductos de las glándulas submandibulares es la zona que se afecta con más frecuencia, apareciendo como una lesión ulcerosa de márgenes irregulares e indurados. En estadios avanzados, puede ocurrir extensión hacia la encía y en profundidad hacia la lengua, haciendo que la fijación de la lengua sea un hallazgo común. Microscópicamente, los CCE en esta localización suelen presentar un grado moderado de diferenciación. En esta localización, las metástasis a los ganglios

linfáticos suelen encontrarse inicialmente en el triángulo submandibular y también en los nódulos de la cadena yugulo-digástrica y en los niveles altos y medios de la cadena yugular (niveles I, II y III).

II.1.E.c. Reborde alveolar

El CCEO de la mucosa alveolar representa aproximadamente el 5% de todos los carcinomas intraorales, y frecuentemente se presenta como una lesión indolora en los sectores posteriores de la mandíbula. La invasión ósea es un hallazgo precoz encontrado con cierta frecuencia. Microscópicamente suelen ser bien diferenciados. Frecuentemente el ligamento periodontal se encuentra invadido, permitiendo un fácil acceso al alveolo y subsecuentemente, al hueso medular de la mandíbula. En estas circunstancias, la movilidad dentaria en ausencia de enfermedad periodontal puede ser el único signo representativo. Otra circunstancia en que se puede sospechar un CCEO es la presencia de un alveolo que no cicatriza tras una extracción dentaria, presentando en su interior una masa de tejido similar a un tejido de granulación o un granuloma piogénico.

II.1.E.d. Mucosa yugal

La mucosa yugal representa aproximadamente el 2% de los CCEO. Suelen ser asintomáticos. En fases iniciales, las lesiones tienden a localizarse en las zonas más posteriores, presentándose con frecuencia como una pequeña úlcera o masas induradas que se relacionan con una leucoplasia preexistente, y con mucha menor frecuencia, con una eritroplasia. Dada la localización primaria de estas lesiones, frecuentemente se asocian a un traumatismo debido a la función masticatoria diaria, lo que conlleva a la ulceración de estas lesiones. En estadios más avanzados pueden llegar a presentar trismus. La extensión hacia la mucosa alveolar mandibular o maxilar se presenta en estadios tardíos, usualmente como un componente exofítico en la fase de crecimiento. Ocasionalmente, la lesión puede presentarse en el surco vestibular, principalmente en el mandibular.

El CCEO localizado en la mucosa yugal no es frecuente en América del norte ni en Europa occidental. Sin embargo, en otras partes del mundo, particularmente en el

sudeste asiático, es una localización mucho más frecuente, lo que se atribuye al hábito de mascar “betel” y tabaco.

II.1.E.e. Paladar

Los CCEO de paladar duro son relativamente raros. Morfológicamente los CCEO en esta localización suelen adoptar un aspecto ulcerado o verrucoso, a menudo rodeado por una leucoplasia. La invasión local de estructuras adyacentes puede ocurrir en estadios más avanzados y es signo de mal pronóstico. El 30% de los tumores presentan metástasis cervicales, que suelen ser ipsilaterales.³⁵ Cuando se consideran los paladares blando y duro como localizaciones independientes, el 71% de los CCEO afectan al paladar blando y el 29% al paladar duro. Aproximadamente el 40% de los pacientes con lesiones primarias en el paladar blando, desarrollan metástasis en los ganglios linfáticos regionales en comparación con el 13% de los pacientes con lesiones de tamaño similar que afectan al paladar duro.²⁵

II.1.E.f. Trígono retromolar

La región del trígono retromolar comprende la mucosa adherida que discurre sobre la rama ascendente de la mandíbula desde la superficie distal al último molar inferior hasta la zona adyacente a la tuberosidad maxilar.³⁶ El trígono retromolar y el paladar blando adyacente, representan aproximadamente un 15% de los CCEO. En estas localizaciones, la presencia de leucoplasias no homogéneas o eritroplasias, que preceden a la lesión maligna, son un hallazgo común. A diferencia de los CCEO localizados más anteriormente, las lesiones en estas localizaciones suelen presentar un grado de diferenciación de moderado a pobre, asociándose la invasión en profundidad a lesiones con pequeñas alteraciones superficiales. Existe un aumento significativo de diseminación regional y a distancia en el momento del diagnóstico inicial, y la presencia de síntomas es frecuente.

II.1.F. Estadíaje

El estadio del cáncer oral depende del tamaño de la lesión primaria y de la diseminación regional o a distancia de la enfermedad. El estadio es importante ya que,

como comentaremos más adelante, tiene influencia sobre el plan de tratamiento y el pronóstico del cáncer oral. Dentro de las clasificaciones más utilizadas se encuentra la TNM, propuesta por American Joint Committee on Cancer (AJCC) ³⁶, la cual se explica a continuación (Tablas 2 y 3).

TAMAÑO DEL TUMOR PRIMARIO (T)	
TX	Tumor primario no puede ser valorado
T0	No existe evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma in situ
T1	Lesión menor de 2 cm en su máximo diámetro
T2	Lesión mayor de 2 cm y menor de 4 cm en su máximo diámetro
T3	Lesión mayor de 4 cm en su máximo diámetro
T4	Lesión mayor de 4 cm que invade estructuras adyacentes (ej. seno maxilar, huesos maxilares, músculos pterigoideos, base de lengua o piel)
GANGLIOS LINFÁTICOS REGIONALES (N)	
NX	Adenopatía cervical no puede ser valorada
N0	No hay adenopatías cervicales clínicamente positivas
N1	Un solo ganglio homolateral clínicamente positivo con 3 cm o menos de diámetro
N2	Un solo ganglio homolateral clínicamente positivo mayor de 3 cm y menor de 6 cm de diámetro; o múltiples ganglios homolaterales clínicamente positivos menores de 6 cm de diámetro; o ganglios bilaterales o contralaterales clínicamente positivos, ninguno mayor de 6 cm de diámetro
N2a	Un solo ganglio homolateral clínicamente positivo mayor de 3 cm y menor de 6 cm de diámetro
N2b	Múltiples ganglios homolaterales clínicamente positivos menores de 6 cm de diámetro
N2c	Ganglios bilaterales o contralaterales clínicamente positivos, ninguno con más de 6 cm de diámetro
N3	Un ganglio clínicamente positivo con más de 6 cm de diámetro
METÁSTASIS A DISTANCIA (M)	
MX	Metástasis a distancia no puede ser valorada
M0	No existe metástasis a distancia
M1	Existe metástasis a distancia

Extensión del tumor primario (T); Ausencia o presencia de afectación de ganglios linfáticos regionales (N); Ausencia o presencia de metástasis a distancia (M)

Tabla 2: Clasificación TNM

ESTADIOS	T	N	M
Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio I	T1	N0	M0
Estadio II	T2	N0	M0
Estadio III	T3	N0	M0
	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N1	M0
Estadio IVA	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	Cualquier T	N2	M0
Estadio IVB	Cualquier T	N3	M0
Estadio IVC	Cualquier T	Cualquier N	M1

Extensión del tumor primario (T); Ausencia o presencia de afectación de ganglios linfáticos regionales (N); Ausencia o presencia de metástasis a distancia (M)

Tabla 3: Estadíaje clínico

II.1.G. Etiopatogenia

La etiopatogenia del cáncer oral es multifactorial, participando en ella fenómenos genéticos, ambientales, agentes químicos, físicos y virales.

Globalmente, el consumo de tabaco en sus varias formas y su asociación con el consumo de alcohol son los factores de riesgo más importantes en el desarrollo del cáncer oral. Ambos factores actúan sinérgicamente, aunque cada uno de ellos posee potenciales carcinogénicos independientes.³⁷ Se estima que 75% de todos los CCEO en los países occidentales se atribuye al consumo de alcohol y tabaco.³⁸ La asociación del tabaco y alcohol está íntimamente relacionada no sólo con el desarrollo del cáncer oral, sino también con el curso de la enfermedad, estando ligada a un mal pronóstico.³⁹

El hábito de fumar sigue siendo el principal factor de riesgo del cáncer oral y los fumadores presentan un riesgo relativo 7 veces más alto en relación a los no fumadores. Este riesgo es muchas veces más alto en los fumadores que tienen un alto consumo de alcohol. Hay evidencias que sugieren que con el cese del hábito de fumar después de un periodo de 10 años, este riesgo elevado se reduce a niveles cercanos a los de personas que nunca han fumado.⁴⁰ Esta información puede ser útil a la hora de motivar a los pacientes para que dejen de fumar.

Además del hábito de fumar, el uso de tabaco, sea en la forma de snuff (tabaco fino molido) o tabaco de mascar (hojas sueltas de tabaco), han sido asociados al cáncer oral.¹¹

La exposición crónica a las radiaciones solares también constituye un factor etiológico del carcinoma de células escamosas de labio, fundamentalmente del labio inferior.²⁵

Otro factor relevante en el desarrollo del cáncer oral es el nutricional, de forma más específica, el posible papel de la ingestión de micronutrientes con un efecto antioxidante. Compuestos naturales de caroteno, selenio dietético, folato, y vitaminas A, C y E parecen ofrecer efectos protectores contra el desarrollo del cáncer.³⁷ Además, una dieta pobre en frutas y vegetales suele ser común en los enfermos de carcinoma oral⁴¹. Según La Vecchia et al.¹⁶ aproximadamente un 15% de los cánceres orales y orofaríngeos se pueden atribuir a deficiencias o desequilibrios dietéticos.

Otros factores etiológicos relacionados al cáncer oral, pero con mucha menos significación estadística, son la sífilis y la disfagia sideropénica.⁴²

Recientemente se ha demostrado la relación etiológica entre el virus del papiloma humano (HPV) y el cáncer oral. Se ha demostrado también, la presencia de este virus en células epiteliales neoplásicas en lesiones *in situ*, invasivas y en metástasis en ganglios linfáticos, además de su probable integración con la estructura genética de algunos de estos tumores.⁴³ La prevalencia de la infección por el HPV en las lesiones premalignas y malignas de la cavidad oral varía ampliamente según los diversos

estudios y recientemente se ha demostrado que esta prevalencia es de 61,5% en los CCEO y de 27,1% en lesiones premalignas.⁴⁴

La infección crónica de los queratinocitos de la mucosa oral por *C. albicans* puede tener su papel en la carcinogénesis oral, una vez que la *C. albicans* estimula la proliferación de las células epiteliales *in vitro* y lesiones orales de candidiasis (candidiasis hiperplásica crónica) muestran displasia epitelial y pueden sufrir degeneración maligna.⁴⁵

Causas etiológicas específicas aparte, se cree que la etiología del cáncer es multifactorial y que el proceso de carcinogénesis evoluciona por pasos, como resultado de múltiples alteraciones genéticas acumuladas.^{46, 47} Estas afectan al comportamiento de las células epiteliales a través de la pérdida de la heterocigosidad cromosómica que a su vez conlleva una serie de fenómenos progresando a un estadio final de carcinoma de células escamosas invasivo. Estas alteraciones genéticas se reflejan en una patología clínica y microscópica, que va desde la hiperplasia hacia la invasividad.²⁰

Califano et al.⁴⁸ propusieron un modelo genético para el CCE de cabeza y cuello basándose en la pérdida del alelo cromosómico y en la acumulación de alteraciones genéticas, y no necesariamente en el orden de los fenómenos genéticos, determinando la progresión de la enfermedad. Cuando analizaron la mucosa aparentemente normal adyacente a lesiones premalignas, algunos de los fenómenos conocidos en las células malignas eran compartidos por estas células morfológicamente benignas. Los fenómenos genéticos posteriores y la evolución de diversos subclones pueden producir alteraciones fenotípicas resultando una variedad de zonas alteradas histopatológicamente en una misma región anatómica. Esos subclones adquieren ventajas en cuanto a la proliferación y crecimiento selectivo sobre las células normales. Estas alteraciones secuenciales y progresivas contribuyeron a la definición del modelo de progresión genética.

II.1.H. Pronóstico

Pese a los avances significativos en las técnicas quirúrgicas de resección y reconstrucción, la radioterapia y la quimioterapia, las tasas de mortalidad no han sufrido mejoras durante estas últimas décadas.

Aproximadamente 7.800 personas en los Estados Unidos (5.100 varones, 2.700 mujeres) y 900 en el Reino Unido ⁴⁹ mueren por el cáncer oral y sus complicaciones cada año. En Brasil, la mortalidad por cáncer oral en el año 2002 fue de 2.715 para hombres y 700 para mujeres, representando unas tasas de 3,15 y 0,78 muertes por 100.000 habitantes/año en hombres y mujeres, respectivamente.⁵⁰

En España, Nieto y Ramos ⁴ describieron un aumento de la mortalidad del cáncer oral durante el período de 1975 a 1994. Aunque en este estudio los autores consideraron conjuntamente el cáncer oral, de orofaringe, de labios y de glándulas salivales.

Las tasas de curación del cáncer oral dependen de su estadio. La tasa de supervivencia a los 5 años es del 80% en estadios iniciales, 40% en neoplasias con afectación regional, y menos del 20% para pacientes con metástasis a distancia.⁵¹ La detección precoz aumenta significativamente la posibilidad de curación del paciente. En el momento del diagnóstico del cáncer oral, el 36% de los pacientes presentan enfermedad localizada, un 43% presentan enfermedad con afectación regional, un 9% presentan metástasis a distancia, y para el 12% restante el estadio de la enfermedad no se puede identificar.⁵² Estos resultados deben considerarse malos si se tiene en cuenta que los carcinomas de células escamosas se forman en el epitelio superficial de la cavidad oral, por lo que producen cambios visibles precoces.

La lesión primaria es la causa de la mitad de las muertes asociadas al cáncer oral, un cuarto de las muertes se deben a una segunda lesión primaria y el restante se atribuyen a otras enfermedades.⁵³

La detección precoz en estadios asintomáticos garantiza no sólo un aumento en las tasas de supervivencia, sino también una mejor calidad de vida, como consecuencia de tratamientos menos agresivos y mutilantes.^{37 42}

II.1.I. Segundos Tumores Primarios y Cancerización de campo

Los exámenes posteriores al tratamiento deben incluir la búsqueda de nuevos tumores primarios, así como de recidivas. El riesgo de desarrollar un segundo tumor primario en el tracto aerodigestivo superior después del primer diagnóstico de un cáncer oral, permanece de por vida. Aproximadamente un 2 a un 3% de los pacientes con cáncer oral desarrollan un segundo tumor primario cada año después de la extirpación de la lesión inicial y el 90% de las recidivas se manifiestan en los primeros dos años post-tratamiento.¹⁴

El segundo tumor primario se puede definir como aquél que se desarrolla geográficamente separado de la lesión primaria por tejido clínicamente sano,⁴² pudiendo aparecer sincrónicamente, con intervalo entre ambas de menos de 6 meses, hablándose entonces de múltiples tumores primarios, o metacrónicamente, si el intervalo es mayor de 6 meses. La incidencia de segundos tumores primarios oscila entre el 5,2 y el 23%^{54, 55}. Ocurren más en varones, menores de 60 años en el momento de diagnóstico del primer tumor. Aparecen la mayoría en el territorio de cabeza y cuello, estimándose que al menos un 50% surgirán en los 2 años posteriores al tratamiento de la primera neoplasia. La supervivencia de estos pacientes a los 15 años es del 20% frente a un 44% de los pacientes que no desarrollan un segundo tumor primario.¹⁸

El concepto de cancerización de campo, que se basa en las múltiples alteraciones genéticas en la superficie epitelial, inducida por agentes carcinogénicos y cocarcinogénicos, sostiene este comportamiento.⁵⁶

En 1953, Slaughter et al.⁵⁷ propusieron el concepto de cancerización de campo en pacientes con CCE de cabeza y cuello. Según ese concepto, el carcinoma oral aparece a partir de áreas multifocales de cambios precancerosos en un área del epitelio que está condicionado por algún agente carcinogénico. En este estudio de 783 pacientes encontraron, a través de cortes histológicos seriados, que en todos los tumores

de la cavidad oral menores de 1cm, había islotes de cáncer invasivo en la mucosa oral adyacente. Este origen multicéntrico, a través de un proceso de cancerización de campo, parece ser un factor importante en la aparición de segundos tumores primarios y la persistencia o recidiva local después del tratamiento. Aunque los autores no proporcionen una definición clara, a partir de un extenso estudio histológico, describen algunas características clínicas agrupadas con el término cancerización de campo.

- El carcinoma oral y orofaríngeo se desarrolla en áreas multifocales de alteraciones precancerosas, a partir de múltiples fenómenos independientes.
- El carcinoma oral y orofaríngeo consiste en múltiples lesiones independientes que a veces confluyen en una única lesión.
- El carcinoma oral y orofaríngeo presenta alteraciones histopatológicas en el tejido, aparentemente normal, adyacente al tumor.

Este concepto guarda relación con el hecho de que toda la superficie oral, y en ocasiones las superficies adyacentes, han sido expuestas repetidamente a carcinógenos. El resultado es la posible formación de varios tumores primarios en esas superficies, por lo general de modo secuencial.⁵⁴

Aunque este concepto haya sido introducido hace 50 años, aún es un concepto contemporáneo debido a la frecuencia con que múltiples tumores primarios se desarrollan en la mucosa del tracto aerodigestivo en pacientes de alto riesgo, lo que tiene un impacto negativo sobre la tasa de supervivencia de esos pacientes.⁵⁸ El desarrollo de múltiples tumores primarios sigue siendo la expresión más clara de la cancerización de campo, siendo frecuente encontrar pacientes con cinco o más lesiones malignas en el tracto aerodigestivo.⁵⁹

La mayoría de los estudios atribuyen la cancerización de campo al efecto del alcohol y tabaco. Una vez que ambos agentes carcinogénicos son amplia y sistemáticamente aplicados en la mucosa del tracto aerodigestivo es de esperar que tengan influencia en el proceso de cancerización de campo.⁶⁰ Según Silverman et al.,⁵⁴ el 30% de los pacientes que continuaron fumando tabaco sufrieron un segundo tumor.

El mecanismo de cancerización de campo aún es desconocido, sin embargo, Odgen ⁶¹ propone 3 hipótesis básicas:

1. Cambios de campo (alteraciones moleculares en toda la extensión de la mucosa oral de pacientes con cáncer oral) pueden predisponer al desarrollo de múltiples tumores primarios. Un único factor etiológico actúa en diferentes localizaciones causando múltiples cánceres por separado con defectos genéticos idénticos, que aparecen como un único clon celular en distintas localizaciones de la mucosa oral. Modificaciones genéticas posteriores, tanto por mutaciones espontáneas, como por la persistencia de la exposición al mutágeno exógeno, permiten la aparición de clones genéticamente distintos. A su vez, agentes etiológicos distintos, actuando en diferentes localizaciones, causan múltiples cánceres por separado con defectos genéticos distintos, cada uno apareciendo como un clon celular diferente dentro de la mucosa oral.
2. Los agentes etiológicos pueden transformar una única célula epitelial. Este clon de células cancerosas se extiende a través de la mucosa oral por difusión tisular local, por difusión vascular local, por la sedimentación por la saliva en la mucosa erosionada o por sedimentación quirúrgica traumática. Eso daría lugar a lesiones en localizaciones geográficas distintas, pero idénticas genéticamente. Otra vez, las modificaciones genéticas posteriores, tanto por mutaciones espontáneas como por la persistencia de la exposición al mutágeno exógeno, enmascaran el origen clonal del tumor en sus diferentes localizaciones.
3. El tumor puede tener un efecto paracrino sobre la mucosa oral adyacente. Esto es, el tumor secreta factores que inhiben la neovascularización. La extirpación del cáncer primario acaba con esta inhibición y por lo tanto promueve la aparición de un segundo tumor primario. Alternativamente, los tumores pueden secretar factores promotores de la apoptosis y la remoción de este tumor reduce la tasa de apoptosis en el tejido adyacente y por lo tanto promueve la aparición de un segundo tumor.

Aunque este concepto de cancerización de campo no sea una novedad, avances recientes en la biología molecular lo avalan, incluyendo la mutación del gen p53 y cambios de aneuploidía entre otras alteraciones moleculares y genéticas.⁵⁹

La identificación del proceso de cancerización de campo tiene su importancia clínica en la prevención en grupos de pacientes con alto riesgo, reversión de lesiones premalignas y prevención de segundos tumores primarios.⁶² Hasta el momento, el aumento de la incidencia de segundos tumores primarios indica que la prevención debe de ser el principal objetivo. Por lo tanto, la identificación de marcadores que predigan la aparición de un segundo tumor primario tiene implicaciones significativas en el pronóstico y manejo del paciente con cáncer oral.¹⁴

II.1.J. Tratamiento

Actualmente, la cirugía y la radioterapia son las dos modalidades de tratamiento del cáncer oral con potencial curativo, y suelen ser empleadas individualmente o en combinación.⁶³ El tratamiento del cáncer oral depende principalmente de la localización y del estadio de la lesión ⁶⁴ (Tabla 4), y del estado de salud general del paciente. Las lesiones en estadios precoces (I y II) son potencialmente curables con cirugía y radioterapia. La elección del tratamiento se basa en la valoración anticipada de los resultados funcionales y cosméticos y en la experiencia particular del cirujano y del radioterapeuta para el tratamiento individual de cada paciente. Las lesiones en estadios avanzados (III y IV) son generalmente tratadas con cirugía seguida de radioterapia. Sin embargo, los resultados de la terapia estándar incluso cuando se emplean la cirugía radical y varias formas de radio y quimioterapia, han permanecido en niveles decepcionantes pese al avance de los tratamientos multidisciplinarios. Una de las razones es que la piedra angular de las decisiones terapéuticas, el sistema de clasificación TNM, complementada con el estadio del grado de diferenciación histológica, ha demostrado que no siempre es un indicador pronóstico satisfactorio.^{30, 65} Por lo tanto, hay una acuciante necesidad de la investigación de nuevos indicadores pronósticos, volcados principalmente en la valoración de la agresividad biológica de las lesiones propias de cada paciente.

Tamaño (T)	Lengua	Suelo de boca	Paladar duro	Trígono Retromolar	Mucosa Yugal	Reborde alveolar
T1	Cirugía	Cirugía	Cirugía	Cirugía	Cirugía o radioterapia	Cirugía
T2	Cirugía	Cirugía o Radioterapia	Cirugía	Cirugía o radioterapia	Cirugía o Radioterapia	Cirugía
T3	Cirugía + Radioterapia	Cirugía + Radioterapia	Cirugía + Radioterapia	Cirugía + Radioterapia	Cirugía + Radioterapia	Cirugía + Radioterapia
T4	Cirugía + Radioterapia + Quimioterapia	Cirugía + Radioterapia + Quimioterapia	Cirugía + Radioterapia + Quimioterapia	Cirugía + Radioterapia + Quimioterapia	Cirugía + Radioterapia + Quimioterapia	Cirugía + Radioterapia + Quimioterapia

Tabla 4. Tratamiento del carcinoma oral de células escamosas según la localización y tamaño de la lesión

II.1.J.a Cirugía

La cirugía implica la resección completa de la lesión con un margen de tejido normal adyacente y, cuando está indicado, algunos o todos los ganglios linfáticos cervicales homolaterales y en algunas ocasiones, los contralaterales.

La cirugía debe involucrar toda la masa tumoral macroscópica y la presumible extensión microscópica de la enfermedad. En caso de ganglios cervicales positivos, la disección cervical radical o funcional se realiza a continuación.⁶⁶ Con las técnicas quirúrgicas actuales, lesiones extensas intraorales pueden ser extirpadas con éxito y con resultados funcionales satisfactorios. Además, las técnicas de reconstrucción permiten alcanzar soluciones estéticas favorables.

II.1.J.b. Vaciamiento ganglionar cervical

La elección de cuando observar o tratar el cuello clínicamente negativo, así como cuando emplear cirugía o radioterapia, sigue siendo motivo de controversia. August et al.⁶⁷ se posicionan en contra de la actitud conservadora “observar y esperar”, una vez que en muchos casos los ganglios valorados inicialmente como normales son detectados a posteriori cuando la enfermedad ya se extendió a través de su cápsula. Shah y Andersen⁶⁸ son partidarios del tratamiento quirúrgico profiláctico del cuello clínicamente negativo, sin embargo, apuntan a que las metástasis ocultas en los CCEO de reborde alveolar, paladar duro y labios son infrecuentes y que en estos casos el tratamiento quirúrgico electivo del cuello no es necesario.

Vaciamiento cervical radical (VCR)	Procedimiento estándar para el tratamiento de los ganglios linfáticos de los niveles I-V con resección simultánea del músculo esternocleidomastoideo, vena yugular interna y nervio accesorio.
Vaciamiento cervical radical modificado (VCRM)	Disección de los ganglios linfáticos de los niveles I-V, preservando una o más estructuras no linfáticas (músculo esternocleidomastoideo, vena yugular interna, nervio accesorio) haciendo distinción entre 3 tipos: <ul style="list-style-type: none"> - VCRM I- Preservación del nervio accesorio - VCRM II- Preservación del nervio accesorio y vena yugular interna - VCRM III- Preservación nervio accesorio, vena yugular interna y músculo esternocleidomastoideo
Vaciamiento cervical profiláctico (VCP)	Preservación de uno o más grupos de ganglios linfáticos incluidos en el VCRM. Se pueden dividir en: <ul style="list-style-type: none"> - Supramiohideo- Disección niveles I- III - Lateral- Disección niveles II- IV - Látero-cervical- Disección niveles I- IV

*Tabla 5: Clasificación de las modalidades quirúrgicas de vaciamiento cervical*⁶⁹

La cirugía posee un papel dominante en el manejo de los pacientes con adenopatías cervicales palpables, y el término vaciamiento cervical se aplica a este tratamiento. El procedimiento original propuesto por Crile⁷⁰ para el tratamiento de los ganglios linfáticos clínicamente positivos se conoce como vaciamiento cervical radical e

implica la extirpación de todos los ganglios linfáticos cervicales profundos (niveles I-V) así como del nervio accesorio, vena yugular interna y músculo esternocleidomastoideo.

Desde entonces, se han propuesto modificaciones de la técnica para preservar estructuras, incluyendo la vena yugular interna y el músculo esternocleidomastoideo, con la finalidad de reducir la morbilidad asociada a este procedimiento. Así, la técnica de vaciamiento cervical radical modificada se ha vuelto la técnica quirúrgica estándar para el manejo del cuello. En pacientes con ganglios linfáticos clínicamente negativos, los niveles superiores (I-III) son los de mayor riesgo de metástasis, y por lo tanto el vaciamiento cervical profiláctico, en el cual se extirpan solamente los ganglios linfáticos superiores, debe ser realizado y se describe como vaciamiento supraomohioideo.⁶⁸

II.1.J.c. Radioterapia

Tanto el cáncer primario como los ganglios linfáticos cervicales pueden ser incluidos en el campo de radiación. Un ciclo completo de radioterapia se expresa generalmente en unidades alrededor de los 66-70 Gray (Gy) (1Gy = 100 rads), las cuales se fraccionan en 32-35 dosis de 2 Gy durante 6-7 semanas.⁶⁴ La radioterapia posee la ventaja de preservación de los órganos, y actualmente es la modalidad de tratamiento primaria de algunos casos de carcinomas de lengua, amígdalas palatinas, paladar blando y faringe. Sin embargo, el tratamiento no está libre de reacciones adversas y es frecuente la aparición de mucositis, xerostomía, candidiasis y en algunos casos osteoradionecrosis.⁷¹

La decisión de emplear o no la radioterapia post-operatoria debe considerar tanto la lesión primaria como la extensión regional de la enfermedad. Cuando los factores relacionados con el tumor primario (lesiones primarias extensas, márgenes quirúrgicos positivos, invasión de los espacios perineural, linfático y vascular) indican el uso de la radioterapia, el cuello debe ser incluido en el campo de tratamiento.⁶³ Cuando los factores relacionados con el tumor primario no indican la radioterapia, la decisión se debe basar en los hallazgos histológicos de la pieza de la disección cervical. En los pacientes en los cuales el estudio histológico ha demostrado la ausencia de metástasis ganglionares la radioterapia no está indicada.⁷² Múltiples ganglios positivos, o la

presencia de diseminación a través de la cápsula de los ganglios son indicaciones absolutas de radioterapia.⁶³

Cuando la radioterapia se combina con la cirugía parece haber una preferencia por la radioterapia postoperatoria. La radioterapia induce una fibrosis tisular lo que hace la cirugía más difícil. Además, los tejidos irradiados poseen una capacidad de cicatrización más lenta.

II.1.J.d. Quimioterapia

El uso de la quimioterapia, en general a través de la combinación de diversas drogas citotóxicas, no ha tenido particular éxito en el tratamiento del CCEO y se considera más una modalidad de tratamiento paliativo que un tratamiento curativo primario. Los principales agentes utilizados han sido el metrotexato, la bleomicina, el cisplatino y el 5-fluoracilo. La quimioterapia puede dar como resultado una disminución temporal del tamaño de la masa tumoral, pero no ha demostrado un aumento significativo en las tasas de supervivencia a los 5 años, control del tumor primario y reducción del potencial metastásico.⁷³ Sin embargo, ensayos clínicos más recientes utilizando la combinación de la quimio y radioterapia en el tratamiento de pacientes con lesiones en estadios avanzados han demostrado resultados preliminares alentadores,⁷⁴ y deben tener su papel en el futuro. Por ahora, su indicación en el tratamiento del CCEO se limita a tumores en estadios avanzados, que debido a su extensión sean considerados como inoperables, o a las recidivas y metástasis tumorales.⁷⁵

II.11.J.e. Futuros conceptos en el tratamiento

Los buenos resultados alcanzados por la cirugía combinada con la radioquimioterapia en los tumores en estadios precoces no pueden ser siempre alcanzados cuando son aplicados a la enfermedad en estadios avanzados. Estos hallazgos indican la necesidad de nuevas modalidades de tratamiento dirigidas específicamente hacia las células tumorales y con daño limitado sobre las células sanas. La terapia dirigida contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es una de estas alternativas, y estudios preliminares han descrito resultados esperanzadores en una amplia variedad de tumores.

1) Terapia dirigida contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico

Trabajos experimentales e investigaciones clínicas sostienen que el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es una importante diana terapéutica para la terapia del cáncer. Como se explicará en el próximo apartado, durante el complejo proceso que ocurre desde la interacción del receptor con el ligando, a través de la transducción de señales y expresión alterada del gen, existen muchas oportunidades para la intervención terapéutica. Las modalidades de tratamiento inhibidores del EGFR que se encuentran en estadios más avanzados incluyen la utilización de anticuerpos monoclonales directamente contra el dominio externo del EGFR, y la utilización de pequeñas moléculas inhibidoras de la actividad tirosina-quinasa del dominio interno del receptor.

Anticuerpos monoclonales

Se han desarrollado anticuerpos monoclonales anti-EGFR contra distintos epitopos. Algunos de estos anticuerpos compiten con el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y otros ligandos, pero no activan el EGFR. La unión con el anticuerpo bloquea el efecto de señalización de crecimiento celular asociado al EGFR por el siguiente mecanismo: (i) unión al dominio extracelular; (ii) internalización del complejo receptor/anticuerpo; (iii) inhibición de las vías de señalización y; (iv) estímulo potencial de la respuesta inmunológica.⁷⁶

Actualmente, diversos anticuerpos monoclonales anti-EGFR se encuentran en distintas etapas de desarrollo clínico, y el cetuximab (Erbix; ImClone Systems) formalmente conocido como IMC-C225 o C225, es el que más ha sido investigado y está siendo probado en ensayos clínicos.⁷⁷ El cetuximab es un anticuerpo monoclonal con alta especificidad para el EGFR, compitiendo por los puntos de unión natural del receptor causando la internalización e infrarregulación del receptor.⁷⁶ Se ha demostrado que el cetuximab inhibe una amplia variedad de líneas celulares neoplásicas de una manera dosis-dependiente. Esta inhibición de la proliferación celular es reflejo de la detención del ciclo celular en la fase G1 y/o aumento de la apoptosis.⁷⁸ El impacto inhibitor del cetuximab en modelos experimentales de tumores xenografos suele ser más pronunciado en comparación con los resultados observados en cultivos celulares, lo

que sugiere que otros mecanismos de inhibición del cáncer estén implicados. Uno de estos mecanismos es la angiogénesis.⁷⁹ El cetuximab inhibe la producción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en células de CCE ocasionando una reducción del número de vasos sanguíneos dentro del tumor.⁸⁰

Estudios fase I/II han sido realizados para investigar la tolerancia al cetuximab en combinación con otras drogas citotóxicas convencionales como el 5-fluoracilo en pacientes con CCE de cabeza y cuello recurrente o metastásico.⁷⁶ Los resultados de un amplio ensayo clínico fase III en 424 pacientes que recibieron tratamiento con radioterapia y/o cetuximab para el tratamiento de CCE de cabeza y cuello en estadios avanzados han demostrado aproximadamente el doble de la media de supervivencia para los pacientes tratados con radioterapia + cetuximab (54 meses), que para los pacientes tratados solamente con radioterapia (28 meses). También se observó una mejoría significativa en el control local de la enfermedad a favor del grupo tratado con cetuximab.⁸¹ Además de proporcionar nuevas opciones potenciales de tratamientos para los pacientes con CCE en estadio avanzado, este ensayo clínico demuestra una mejoría en la supervivencia al utilizar un agente dirigido para aumentar la sensibilidad a la radiación. Estos hallazgos van a favorecer la realización de nuevos ensayos clínicos en otros tipos de cánceres donde la radiación juega un papel principal en el tratamiento.

Moléculas pequeñas inhibidoras de la tirosina quinasa.

Ésta es la más larga y más prometedora línea terapéutica. Los inhibidores de la tirosina-quinasa son derivados sintéticos, en la mayoría derivados de las quinazolininas, de pequeño peso molecular que interactúan con el dominio intracelular con actividad tirosina-quinasa de diversos receptores, incluyendo el EGFR, inhibiendo la fosforilación inducida por la unión ligando/receptor.⁸² Estas moléculas actúan directamente en la inhibición de la fosforilación de la tirosina a través de la interacción física con el receptor a través del siguiente mecanismo de acción: (i) unión al dominio intracelular; (ii) inhibición de la actividad tirosina- quinasa y; (III) inhibición de las vías de señalización del EGFR.⁷⁶

El gefitinib (Iressa, AstraZeneca), formalmente conocido como ZD1839, una quinazolinina, es el inhibidor tirosina quinasa EGFR más desarrollado. El gefitinib es una

anilinoquinazolina de bajo peso molecular, activo por vía oral, que inhibe diversos receptores con actividad tirosina-quinasa, incluyendo el EGFR.

El gefinitib ha demostrado actividad antiproliferativa en células neoplásicas en cultivos y tumores humanos xenografos, tanto como agente único o en combinación con radio y quimioterapia.⁷⁶ Estudios preclínicos indican que el gefinitib afecta muchas de las vías de señalización intracelular inhibidas por los anticuerpos monoclonales. Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que el gefinitib inhibe el crecimiento de líneas celulares de diversos tipos de cánceres humanos, y hay evidencias de que esta inhibición se da a través de la detención del ciclo celular y del aumento de la apoptosis.⁸³

En líneas celulares de CCEO, el gefinitib ha inducido la detención de la fase G1 del ciclo celular y la sobrerregulación de la p27.⁸⁴ Otros estudios experimentales han demostrado que el gefitinib aumenta la radiosensibilidad de líneas de CCEO implantadas en ratas, por múltiples mecanismos que incluyen la inhibición de la proliferación y regulación del mecanismo de reparación del daño del ADN después de la exposición a la radiación.⁸⁵

2) Inducción de la apoptosis

La elucidación de los mecanismos de la apoptosis y su correlación con la carcinogénesis oral ha generado un optimismo acerca de la aplicación de esos conocimientos con objetivos terapéuticos⁸⁶. De hecho, hay investigaciones para el desarrollo de estrategias que permitan manipular la maquinaria apoptótica. Esas intervenciones tienen como objetivo restaurar la función apoptótica o compensar otras alteraciones celulares, permitiendo el tratamiento etiológico de una serie de condiciones.^{87 88}

3) Agentes anti-angiogénesis

Los factores asociados con la angiogénesis en los CCEO han sido utilizados como dianas terapéuticas en nuevas modalidades de tratamiento del cáncer oral. Los tumores sólidos no pueden crecer entre 1 y 2 mm en diámetro sin inducir la formación

de nuevos vasos sanguíneos que les facilite el aporte de nutrientes necesarios. El bloqueo del desarrollo de nuevos vasos sanguíneos priva al tumor de nutrientes y oxígeno, y por lo tanto inhibiría el crecimiento del tumor y su diseminación a otras zonas del organismo. Actualmente existen distintas estrategias anti-angiogénesis siendo investigadas en ensayos clínicos: 1) bloqueo de la habilidad de las células endoteliales en romper la matriz extracelular adyacente, utilizando inhibidores de las metaloproteinasas (MMPs); 2) inhibición directa del crecimiento de las células endoteliales; 3) bloqueo de los factores que estimulan la angiogénesis, por ejemplo el bloqueo de la señal del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF); y 4) bloqueo de las integrinas, moléculas de la superficie de las células epiteliales que garantizan la supervivencia de las células endoteliales y promueven la angiogénesis.¹⁴

II.2. BASES GENÉTICAS DEL CÁNCER ORAL

El conocimiento del ciclo de división celular en condiciones normales es esencial para comprender las alteraciones que ocurren durante el proceso de la carcinogénesis oral. El descontrol del ciclo celular es una marca fundamental de la progresión del cáncer.⁸⁹ Muchas de las alteraciones moleculares que causan el comportamiento anormal de las células neoplásicas se basan en alteraciones del ciclo celular.⁹⁰

II.2.A. Ciclo celular

El ciclo celular consiste en una serie de fases durante las cuales ocurren cambios que conllevan a la división celular. El ciclo celular consiste en una fase estacionaria (G0 Gap 0), que con la recepción de señales celulares adecuados es seguido por las fases G1, S, G2 y finalmente la mitosis (M).⁹¹

1. Fase G0 o fase de quiescencia:

En esta situación se encuentran la mayor parte de las células del organismo. En esta fase no se detecta actividad de síntesis proteica y la célula no forma parte del ciclo celular, pero, tras un estímulo adecuado, es susceptible a reincorporarse en el ciclo. La duración de esta fase es variable.

2. Fase G1:

Durante esta fase tiene lugar la síntesis de ARN y proteínas, pero no hay replicación de ADN. Es la fase de mayor duración del ciclo y su duración también es variable. A esta fase se incorporan las células que han estado en la fase G0.

3. Fase S o fase de síntesis:

En esta fase tiene lugar la síntesis de ADN y la duplicación del genoma humano. Se inicia la síntesis de ADN y termina cuando el contenido de ADN del núcleo se ha duplicado y cada cromosoma ha dado lugar a dos cromátides idénticas, o sea, durante la fase S el contenido de ADN aumenta desde un estado diploide $2n$ hasta el valor de replicación $4n$. Dura entre siete y doce horas.

4. Fase G2:

Es el periodo desde el final de la fase S hasta la mitosis. Es una fase de aparente inactividad, durante la cual la célula tiene dos juegos diploides completos de cromosomas. Dura entre una y seis horas.

5. Fase M o fase de mitosis:

Fase en la que se produce la segregación de los cromosomas dando lugar a la división de las cromátides hermanas y tiene lugar tanto la división nuclear (mitosis) como la división del citoplasma (citocinesis). Dura entre una y dos horas.

La progresión del ciclo celular requiere la actuación coordinada de una compleja red de proteínas reguladoras que funcionan como interruptores bioquímicos que controlan sus principales fases e integran señales intracelulares y del medio extracelular, mitogénicas o antiproliferativas, para adecuar la división celular a las necesidades celulares o tisulares.

La transición de una fase del ciclo celular a la siguiente es controlada en “puntos de control o restricción” antes de que el ciclo pueda progresar. Cuando existe un daño

del ADN, los genes que controlan estos puntos de control detienen el ciclo celular para facilitar la reparación del ADN. La detención en la fase G1 previene la replicación del ADN dañado y la detención en la fase G2 permite la segmentación de los cromosomas dañados.

Los principales factores que regulan la progresión del ciclo celular son las ciclinas y las quinasas ciclina-dependientes (CDKs). Hay cuatro clases de ciclinas, según el estadio del ciclo celular en el que actúan y a la CDK a la que se unen. De ese modo cada uno de los distintos complejos ciclinas-CDKs sirve como un interruptor molecular que dispara un suceso específico en el ciclo celular. Por ejemplo, la progresión de la fase estacionaria G0 hacia la fase G1 es mediada por dos complejos ciclinas-CDKs (CDK 4/Ciclina D1, y CDK2/Ciclina E).

Las CDKs activas conducen el ciclo celular mediante la fosforilación de proteínas específicas que se requieren para la progresión de las células a la siguiente fase. Por ejemplo, las ciclinas pueden fosforilar y por lo tanto inactivar la proteína del gen del retinoblastoma (pRb), mientras los inhibidores de CDK pueden desfosforilar la pRb permitiendo la liberación de factores de transcripción cruciales, como por ejemplo la familia E2F y revertiendo esta inactivación.

Las CDKs se encuentran en forma inactiva durante todo el ciclo celular, y únicamente se activan por fosforilación después de unirse a las ciclinas. Las ciclinas, al contrario que las CDKs, se sintetizan únicamente durante algunas fases específicas del ciclo. Por ello, una vez finalizado, el complejo se disocia y los niveles de ciclina disminuyen rápidamente cuando la célula entra en la siguiente fase, siendo sustituida por otro tipo de ciclina específica.

II.2.A.a. Regulación del ciclo celular y cáncer oral

En condiciones normales, la división de los queratinocitos orales es estimulada por los factores de crecimiento epidérmicos (EGF) al unirse con sus receptores, receptores de factores de crecimiento epidérmicos (EGFR), localizados en la membrana celular de los queratinocitos de la capa basal. La unión entre ligando y receptor activa la

proteína raf y posteriormente da inicio a un proceso en cascada de activación de otras quinasas citoplasmáticas (MEK, MAPK).

Esta cascada de activación de las quinasas transmite la señal externa de crecimiento desde la membrana celular hacia el núcleo donde los niveles de quinasas aumentan bruscamente. La proteína c-myc se une al ADN y estimula la transcripción de la ciclina D, que se une y activa las CDKs. Las CDKs activadas catalizan la fosforilación de la proteína supresora de tumores (pRb). La pRb fosforilada (activa) libera los factores de transcripción (E2F) que son necesarios para la transcripción de proteínas de replicación del ADN. La replicación de ADN antecede a la división celular. Las ciclinas D y la mayoría de las proteínas de replicación del ADN se degradan necesitando ser transcritas nuevamente en cada ciclo de división celular. La mayoría de estas proteínas, que transmiten la señal de crecimiento a partir de la membrana hacia el núcleo, son codificadas por oncogenes. Mutaciones en estos oncogenes pueden estimular la proliferación excesiva de los queratinocitos en el cáncer oral.

La patogénesis del cáncer oral depende de la adquisición de seis habilidades fundamentales por parte de las células neoplásicas: 1) autosuficiencia de las señales de crecimiento, 2) insensibilidad a las señales inhibitoras del crecimiento, 3) evasión de la muerte celular programada (apoptosis), 4) potencial replicativo ilimitado, 5) mantenimiento de la angiogénesis, y 6) capacidad de invadir los tejidos y producir metástasis.⁹² Estos comportamientos no son independientes uno del otro y son resultado de un complejo proceso de alteraciones genéticas en múltiples etapas. Como parte del proceso de adquisición de estas habilidades, se han experimentado modificaciones moleculares o genéticas específicas, algunos de las cuales se describen a continuación.

II.2.B. Oncogenes

Los protooncogenes son genes normales que afectan la proliferación y la diferenciación celular, pudiendo convertirse en oncogenes a través de mutaciones puntuales, deleciones, translocaciones, o amplificación genética.⁹³ Los oncogenes son genes cuyos productos se asocian a la transformación neoplásica a través de la producción de proteínas que regulan el ciclo celular. Según la función de sus productos

proteicos, los oncogenes se pueden dividir en: factores de crecimiento, receptores transmembrana, mensajeros citoplasmáticos y factores nucleares de transcripción.⁹⁴

Diversos oncogenes han sido asociados a la carcinogénesis oral. Se cree, que la expresión aberrante de los oncogenes receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR/*c-erb* 1) y CCND1/ciclina D1 contribuyen al desarrollo del cáncer oral.⁹⁵

Los oncogenes codifican muchas de las proteínas transmisoras de señales por las cuales las células responden a señales de crecimiento externos. Las células normales, con oncogenes normales, no dan inicio al proceso de replicación del ADN y división celular sin el estímulo de señales externas. Sin embargo, cuando existen mutaciones en los oncogenes, las oncoproteínas mutadas pueden enviar un estímulo de crecimiento desde el citoplasma hacia el núcleo mismo en ausencia de señalización externa. De esta manera, la proliferación autógena de las células que poseen oncogenes mutados da como resultado la aparición de tumores.

La señalización celular es esencial para dar paso a los mensajes desde la membrana plasmática hasta el núcleo celular. Ejemplo de este mecanismo de señalización lo constituye el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR).

II.2.B.a. Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)

El EGFR es un miembro de la familia de receptores *c-erbB*. Los receptores de la familia *c-erbB* son receptores transmembrana con actividad tirosina-quinasa intrínseca. La familia de receptores *c-erbB* consta de 4 miembros: el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR/ *c-erbB*-1/ HER-1), *c-erbB*-2 (HER-2/Neu), *c-erbB*-3 (HER-3) y *c-erbB*-4 (HER-4).⁹⁶

El gen *EGFR* (*erbB1*) localizado en el cromosoma 7p13-q22, codifica un receptor involucrado en la señalización celular, el cual es un receptor transmembrana con actividad tirosina-quinasa específica, que se liga a varios ligandos, incluyendo el factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformante- α (TGF- α), ampirregulina, betacelulina, cripto y epirregulina, activando la señalización intracelular vía proteínas tirosina-quinasa.⁹⁷

El EGFR es una glicoproteína transmembrana que contiene un dominio extracelular, donde se une el ligando, una región transmembrana, y un dominio intracelular, con actividad tirosina-quinasa intrínseca. La interacción de los ligandos activos con el dominio extracelular induce la homo o heterodimerización y subsiguiente fosforilación del receptor, resultando en la activación de la cascada de señalización celular. Estos acontecimientos, eventualmente, llevan a la proliferación celular, inhibición de la apoptosis, estimulación de la invasión y metástasis.⁹⁸

La sobreexpresión de EGFR en el cáncer humano fue descrita por primera vez en líneas de células tumorales de CCE en vulva.⁹⁹ Posteriormente, la sobreexpresión de EGFR ha sido observada en una amplia variedad de tumores en humanos, entre ellos, cáncer de mama, ovario, próstata, vejiga, pulmón, cerebro y páncreas.¹⁰⁰ La sobreexpresión de EGFR también ha sido descrita en el CCE de cabeza y cuello y en el CCEO¹⁰¹.

Al principio, la sobreexpresión de la proteína fue atribuida a la amplificación del gen. Sin embargo, estudios en líneas celulares y muestras de tejido de CCE de cabeza y cuello han demostrado que la amplificación del gen no es un hallazgo común y diversos de los tumores presentan sobreexpresión del gen sin amplificación. Además, no se ha encontrado correlación entre la amplificación del gen y los parámetros clínico-patológicos de los tumores estudiados. Analizados conjuntamente, los estudios sugieren que la amplificación del gen no juega un papel esencial en el aumento de la expresión de EGFR frecuentemente observado en la superficie de las células de CCE de cabeza y cuello, sugiriendo que el paso clave puede deberse a la sobreexpresión de RNAm o la sobreproducción de la proteína.¹⁰²

La sobreexpresión del EGFR también es frecuente en el cáncer oral y la amplificación del gen EGFR aparece en un 30% de los casos con sobreexpresión de la proteína.¹⁰³

En lesiones premalignas, la expresión de EGFR parece aumentar proporcionalmente al grado de displasia epitelial. Grandis et al.¹⁰⁴ encontraron un aumento de la expresión de EGFR en la mucosa oral normal adyacente al CCE de cabeza y cuello en comparación con la mucosa oral normal de pacientes controles.

Además, encontraron que la expresión de EGFR aumentó según la progresión de la displasia hacia grados más severos. Por último, los autores observaron un intenso aumento de la expresión de EGFR en los CCE en comparación con los distintos grados de displasia.

Hallazgos similares fueron descritos por Shin et al.,¹⁰⁵ que además observaron que a medida que la displasia avanzaba hacia grados más severos la expresión de EGFR se expandía hacia las capas más superficiales del epitelio.

Se ha sugerido que la sobreexpresión del EGFR suele estar acompañada de la producción de sus ligandos, TGF- α y EGF. La interacción entre el receptor y sus ligandos da inicio a una cascada de eventos, trasladando la señalización extracelular a través de la membrana celular hacia el interior de la célula engatillando la actividad tirosina quinasa intrínseca. Mutaciones en los genes que codifican los receptores de los factores de crecimiento pueden resultar en un aumento del número de receptores, o la producción de señales mitogénicas continuas independientes del ligando. La amplificación del gen y un aumento en el número de los EGFR en el cáncer oral se asocian con el grado de diferenciación y agresividad de los tumores.¹⁰⁶ Se ha descrito que los CCEO con sobreexpresión de EGFR exhiben una respuesta más alta a la quimioterapia en comparación con los tumores EGFR negativos. Posiblemente eso se deba a la actividad proliferativa más alta en los tumores con sobreexpresión de EGFR, llevando a una mayor sensibilidad a las drogas citotóxicas.¹⁰⁷ Investigaciones actuales sugieren que la aplicación terapéutica de anticuerpos contra los EGFRs puede ser útil en el tratamiento de lesiones malignas y premalignas.¹⁰⁸

El EGFR contribuye a la regulación del ciclo celular influenciando los niveles de ciclina D1.¹⁰⁹ La expresión de EGFR ocurre en lesiones premalignas y malignas de cabeza y cuello,¹⁰⁵ y se ha relacionado la expresión de EGFR con las tasas de supervivencia y con el pronóstico en estos pacientes.¹¹⁰ Estudios publicados recientemente sugieren que la amplificación del gen EGFR ocurre en un estadio relativamente precoz del desarrollo del CCEO.¹¹¹

Diversos estudios han demostrado un aumento de la expresión del EGFR en el epitelio histológicamente normal adyacente al CCE de cabeza y cuello.^{112,113,114} Se ha

demostrado también, un aumento de la expresión de EGFR en el epitelio normal adyacente al CCE de cabeza y cuello tanto en pacientes fumadores y bebedores, como en pacientes que no presentaban estos factores de riesgo.¹¹⁵ Se ha encontrado que el patrón de tinción en el tejido normal adyacente al tumor estaba más localizado en el citoplasma que en la membrana, en contraste con el epitelio normal usado como control.¹¹⁵

Las células con un aumento de la expresión del EGFR poseen una ventaja en el crecimiento en comparación con otras células. Especialmente, como se ha demostrado, cuando el aumento de la expresión del EGFR se acompaña de un aumento de la expresión de sus ligandos TGF- α .¹¹⁴ Esta observación del aumento de la expresión del EGFR en el tejido normal adyacente al tumor podría explicar el desarrollo de recidiva precoz y de segundos tumores primarios después de la cirugía. Así, una terapia dirigida contra el EGFR podría estar indicada en estos pacientes.

II.2.B.b. Ciclina D1

Las ciclinas, conjuntamente con las quinasas ciclina-dependientes (CDKs) son reguladores positivos de la progresión del ciclo celular. El producto del gen *CCND1/ciclina D1* fosforiliza el producto del gen retinoblastoma (*RB*) lo que conlleva a la transición de la fase G1 a la fase S del ciclo celular. La actividad de la ciclina D1 es inhibida por diversos genes supresores de tumores, entre ellos *P16*, *P21*, y *P27*.¹¹⁶

La expresión y amplificación de la ciclina D1 fue encontrada entre un 20 y un 68% de los carcinomas de la cavidad oral. Mientras muchos estudios encontraron una correlación entre la ciclina D1 y el pronóstico en grupos heterogéneos de cánceres de cabeza y cuello, mostrando asociación con recidivas, metástasis linfáticas y pobre supervivencia de los pacientes,¹¹⁷ esta correlación no pudo ser demostrada cuando se investigaron exclusivamente carcinomas de la cavidad oral.^{118,119}

II.2.C. Genes supresores de tumores

No solamente la activación de los oncogenes es capaz de dar origen a una célula neoplásica. La inactivación de los llamados genes supresores de tumores puede también

ser considerada como uno de los eventos iniciales en la carcinogénesis. Estos genes actúan interrumpiendo el ciclo celular o bien induciendo la célula a la apoptosis, impidiendo por tanto la perpetuación de las mutaciones incompatibles con el funcionamiento normal de la célula. A diferencia de los oncogenes, que pueden ser afectados a través de mutaciones de solamente una de las dos copias de los genes, los genes supresores de tumores son inactivados por mutaciones puntuales, reordenaciones o deleciones en las dos copias de los genes. Aunque con un número reducido, los genes supresores de tumores juegan un papel fundamental en el proceso de la carcinogénesis.

Se ha propuesto la división de los genes supresores de tumores en dos grupos. El primer grupo, los llamados “gatekeepers” controlan las vías de proliferación celular. Típicamente los genes “gatekeepers” son reguladores negativos del ciclo celular. El segundo grupo, los llamados “caretakers” controlan la precisión del proceso de división celular. Usualmente, estos genes están involucrados en la reparación del ADN y en el control de la estabilidad genética. Su inactivación no da lugar a la proliferación celular *per se*, pero permite la adquisición rápida de otras alteraciones genéticas.¹²⁰

La inactivación de los genes supresores de tumores se puede dar a través de pérdida de heterocigosidad, deleciones o inserciones, silenciamiento transcripcional por alteración en la región promotora, o mutaciones puntuales.

II.2.C.a. Gen *P53*

La mutación del gen supresor de tumor *P53* es uno de los cambios genómicos más frecuentes y más investigados en el cáncer humano.¹²¹ El gen *P53* se localiza en el brazo corto del cromosoma 17, y codifica una fosfoproteína de 53 kDa que tiene como función la regulación de la transcripción genética, la síntesis de ADN y su reparación, la coordinación del ciclo celular y la muerte celular programada.¹²² Estas funciones se deben a la capacidad de la p53 de modular la expresión de diversos genes.¹²³

En condiciones normales, la proteína supresora de tumores p53 detecta daños en el ADN e interrumpe la progresión del ciclo celular en la transición de la fase G1-S. Después del daño en el ADN, ocurre un aumento en el nivel de la p53 que a su vez estimula la transcripción de la proteína p21, codificada por el gen *WAF1/CIP1*. Esta

proteína es una inhibidora de las CDKs que bloquea la fosforilación de la pRB, que a su vez bloquea la liberación de las proteínas de transcripción (E2F), bloqueando así la replicación del ADN.¹²⁴ Sin embargo, la expresión del gen *WAF1/CIP1* también es inducida por una vía independiente de la p53, como por ejemplo por los factores de crecimiento: factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PTGF), factor de crecimiento fibroblástico (FGF) y factor de crecimiento transformante beta (TGF- β).⁹⁸

Si por algún motivo ocurre un fallo en este mecanismo de control, la p53 induce la célula a apoptosis, impidiendo por lo tanto que células con el ADN dañado proliferen.

Las mutaciones en el gen *P53* permiten que células neoplásicas atraviesen la fase G1-S y propaguen sus alteraciones genéticas que pueden llevar a la inactivación de otros genes supresores de tumores o a la activación de oncogenes.⁹⁵ En el CCEO, la mutación del gen *P53* parece ocurrir durante la transición del carcinoma superficial hacia el carcinoma invasivo.¹²⁵ Las mutaciones del gen *P53* ocurren como mutaciones puntuales o deleciones. Las mutaciones puntuales resultan en una proteína estructuralmente alterada que secuestra la proteína salvaje, causando su inactivación y, por lo tanto, inactivando su actividad supresora. Las deleciones dan lugar a la reducción o pérdida de expresión y función de la p53.

Además, las mutaciones del gen de la p53 con subsiguiente sobreexpresión representan un evento frecuente en la displasia epitelial y en el CCEO. El aumento del riesgo de transformación maligna en lesiones displásicas con un aumento de la sobreexpresión suprabasal de la p53¹²⁶ y el comportamiento agresivo y el pobre pronóstico del cáncer de cabeza y cuello con mutaciones de la p53 apuntan al significado pronóstico de las alteraciones de la p53.^{127,128}

II.2.C.b. Gen *P27*

El gen *P27/KIP1* que se localiza en el cromosoma 12p12-12p13.1, también juega su papel en la detención del ciclo celular en la fase G1, regulando la proliferación a través de la unión e inhibición de las ciclinas G1/complejos CDK.

Las mutaciones en el gen *P27* son raras, sin embargo han sido descritas en diversos tipos de tumores malignos humanos.¹²⁹ Por otro lado, diversos estudios han descrito la pérdida o la disminución de la proteína p27 en diversos tipos de neoplasias. Además, se ha asociado la infrarregulación de la proteína p27 con la agresividad de los tumores y la supervivencia.¹³⁰

Aunque los niveles de RNAm del *P27* no cambien durante la progresión del ciclo celular, los niveles de la proteína p27 sufren un cambio durante el ciclo celular, con niveles máximos de expresión durante la fase G1 y G0. La disminución de la expresión de la proteína p27 se debe principalmente a un aumento en su tasa de degradación.

En el epitelio oral normal, las células de los estratos espinoso y granular presentan una fuerte expresión de la proteína p27 en el núcleo celular.¹³¹ Diversos estudios han descrito una reducción de la expresión de la proteína p27 en lesiones con displasia epitelial severa y que la expresión disminuía con la progresión hacia un CCEO.^{132,133} Se ha descrito también, la infrarregulación de la proteína p27 en CCEO en estadios muy tempranos de invasión.¹³⁴ Estos estudios indican que la reducción de la expresión de la proteína p27 ocurre en estadios muy tempranos de la carcinogénesis oral.

Diversos estudios sugieren que la disminución de la expresión de la proteína p27 puede ser utilizada como marcador del pronóstico en pacientes con CCEO. Kudo et al.¹³⁵ han descrito la infrarregulación de la proteína p27 en el 87% de los casos estudiados, y la pérdida de expresión se ha correlacionado con un comportamiento más agresivo del tumor, incluyendo el aumento del potencial metastásico y la disminución de la supervivencia de los pacientes.

II.2.D. Proliferación Celular

La proliferación celular se puede definir como “el aumento del número de células resultante de la conclusión del ciclo celular”.¹³⁶ La tasa de proliferación de un cáncer depende de distintos factores tales como la proporción de células que proliferan (fracción de proliferación), la duración del ciclo celular y el factor de la pérdida celular

(debido a la muerte y a la diferenciación celular). El estudio de la fracción de proliferación tiene gran importancia, ya que no deja de ser el reflejo del comportamiento del cáncer, cuanto mayor sea la fracción de proliferación, mayor será el crecimiento del tumor.

La hiperproliferación es un marcador precoz, aunque no específico, de un desorden en el crecimiento. Se acepta generalmente que un aumento en la proliferación se asocia con lesiones en estadios más avanzados y que la distribución de las células proliferativas en el tejido pueda darnos más información acerca del mecanismo de regulación que pierde su funcionalidad durante el proceso de la carcinogénesis en múltiples pasos.

Se han desarrollado distintos métodos para la detección de la tasa de proliferación celular. Estos métodos difieren no solamente en lo que detectan, sino también en la fase del ciclo celular que marcan. Estos métodos incluyen la cuantificación de figuras mitóticas, el marcaje de la fase S mediante timidina tritiada o de su análogo bromodeoxiuridina (BrdU) y, más recientemente, la citometría de flujo y la inmunohistoquímica.

El índice de mitosis,¹³⁷ se basa en la evaluación estática del número de figuras mitóticas en diez campos microscópicos de gran aumento. El índice marcado con timidina tritiada¹³⁸ o de su análogo bromodeoxiuridina,¹³⁹ se basa en la evaluación en tejido fresco de la incorporación activa del precursor de la síntesis de ADN. Una autorradiografía permite estimar la cantidad de células que se encuentran en la fase proliferativa. Otro método es la demostración de regiones organizadoras nucleares por métodos argénicos (contaje de AgNORs).¹⁴⁰ La citometría de flujo hace posible las estimaciones estáticas¹⁴¹ y dinámicas,¹⁴² dependiendo del método empleado.

Actualmente hay mucho interés en el estudio de la utilidad clínica de marcadores inmunohistoquímicos de proliferación celular, especialmente de marcadores nucleares. Numerosas proteínas se expresan de manera diferente durante las distintas fases del ciclo celular, incluyendo la duplicación de ADN durante la replicación celular. La proliferación celular de las displasias y del cáncer oral ha sido ampliamente estudiada

mediante diferentes técnicas.¹⁴³ Entre ellas los dos marcadores más comúnmente utilizados son el PCNA y el Ki-67/MIB-1.¹⁴⁴

II.2.D.a. Antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA)

El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), miembro de la familia de las ciclinas, es un componente auxiliar de la DNA-polymerasa- δ que aparece en células en proliferación.¹⁴⁰

En la mucosa oral normal y en lesiones hiperplásicas, la inmunorreactividad para la PCNA aparece limitada a las células proliferativas de la capa basal, pero en lesiones displásicas esta expresión aumenta e incluso se extiende a las capas suprabasales. El conteo de PCNA se correlaciona inversamente con el grado de diferenciación.^{140, 145, 146} Un estudio sugiere que el conteo de PCNA disminuye después de la quimioterapia, proponiendo la utilidad de este marcador para monitorizar la respuesta a la terapia.¹⁴⁵

II.2.D.b. Ki-67 (MIB-1)

El antígeno Ki-67 es una proteína nuclear (no histona) que se expresa en todas las fases del ciclo celular (G1, S, G2 y M), pero está ausente en las células en reposo (G0).¹⁴⁷ El gen para este antígeno se localiza en el brazo largo del cromosoma 10 (10q25), y el Ki-67 reconoce dos proteínas de 345 y 390 kDa.¹⁴⁸

La expresión de Ki-67 empieza en la fase G1, aumenta progresivamente durante las fases S y G2 y alcanza un pico en la mitosis (M). Después de la división, las células regresan a la fase G0 con un stock de Ki-67, el nivel disminuye progresivamente durante esta fase.¹⁴⁹ Durante la interfase, el Ki-67 puede ser detectado exclusivamente dentro del núcleo, mientras que durante la mitosis gran parte de la proteína es trasladada a la superficie de los cromosomas. El antígeno es rápidamente degradado cuando la célula entra en estado no-proliferativo,¹⁵⁰ y parece no haber expresión de Ki-67 durante el proceso de reparación del ADN.¹⁵¹ La función exacta de esta proteína sigue sin conocerse.¹⁵²

El MIB-1 es un anticuerpo monoclonal equivalente al anticuerpo anti- Ki-67, con la ventaja de que aquél puede ser utilizado en secciones de tejidos conservados en parafina.¹⁵³

En términos de resultados de tinción, el Ki-67/MIB-1 generalmente posee menos fondo y más contraste que el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA),¹⁵³ por lo cual la tinción con el Ki-67/MIB-1 es más fácil de interpretar y cuantificar. Por lo tanto, la determinación de la proteína Ki-67 puede ser empleada para medir la fracción de crecimiento del tejido normal y de tumores malignos.¹⁵⁴

Las lesiones premalignas de distintas localizaciones anatómicas se caracterizan por un aumento en la proliferación celular,^{155,156} y ésta, en general, se relacionan al grado de displasia epitelial. Por lo tanto, los marcadores de proliferación celular pueden ser útiles en la valoración del tipo y grado de las lesiones premalignas orales. Así, los cambios en la capacidad proliferativa de las lesiones premalignas orales puede revelar los cambios preneoplásicos precoces e indicar su potencial de transformación maligna.¹⁵³

Se ha demostrado también que el índice de marcaje del Ki-67 se corresponde con el grado histológico de las lesiones leucoplásicas de la cavidad oral, siendo éste mayor cuanto mayor es el grado de displasia.^{157, 158} Estas observaciones sugieren que un desorden en la proliferación puede ser una consecuencia temprana de la exposición a agentes carcinogénicos. El valor pronóstico del Ki-67 en las lesiones premalignas sigue sin ser demostrado.¹⁵⁹

Recientemente la expresión de Ki-67 fue estudiada en lesiones malignas y premalignas de la cavidad oral.¹⁶⁰ El patrón de distribución de la Ki-67 en lesiones hiperqueratósicas y lesiones con displasia se da principalmente en las capas basal y suprabasales del epitelio, mientras en la mucosa oral normal se da principalmente en la capa basal. En lesiones de CCEO la mayoría de las células malignas se tiñen intensamente con Ki-67. La proliferación celular medida por la expresión de Ki-67 en el frente de invasión tumoral demostró una correlación fuertemente positiva con el grado de diferenciación histológica.¹⁶¹

Se ha demostrado que los altos índices de Ki-67 observados en el CCEO poseen relación con la progresión de la enfermedad siendo indicativos de un pobre pronóstico.^{133, 162, 163}

No sólo la valoración cuantitativa, sino también la valoración cualitativa, parecen ser indicativas del comportamiento del CCEO. La expresión suprabasal de la proteína Ki-67 en lesiones orales con displasia y lesiones malignas se correlaciona con un pobre pronóstico, con recidivas y metástasis linfáticas cervicales.¹⁶⁴

Se ha descrito que la expresión de Ki-67 es un factor indicativo del fracaso del tratamiento. En una larga serie de CCE de la cavidad oral y orofaringe tratados con cirugía y radioterapia el índice de proliferación más alto fue indicativo de recidivas tempranas.¹⁶⁵ Resultados similares fueron descritos en el CCE de lengua.¹⁶³

Se ha demostrado también la correlación entre la expresión de las proteínas p53 y Ki-67 en lesiones premalignas y malignas de la cavidad oral.¹⁶⁰ En circunstancias normales, como ya hemos visto, la p53 regula el ciclo celular induciendo la detención de la fase G1 o la apoptosis en células dañadas genéticamente.¹⁶⁶ Para los autores, la correlación significativa entre la p53 y Ki-67 sugiere que alteraciones en la p53 llevan a un aumento de la proliferación celular. Recientemente se ha demostrado *in vitro* que tanto la p53 mutante y Ki-67 se sobreexpresan en células malignas y premalignas.¹⁶⁷ En conjunto, esos hallazgos indican que la Ki-67 puede ser utilizada como marcador pronóstico en el CCEO.

II.2.E. Apoptosis

El denominador común de diversos procesos neoplásicos es el crecimiento anárquico y autónomo de sus células. Este aumento se debe tanto a una proliferación celular intensa a como una muerte celular insuficiente.^{168,169} Consecuentemente, mutaciones y otras alteraciones moleculares que impiden la apoptosis pueden jugar un importante papel en la patogenia y en la progresión de distintas neoplasias. La apoptosis es una forma de muerte celular programada genéticamente que se distingue por la activación de una familia de proteasas cisteína-aspartato (caspasas) que rompen varias proteínas originando cambios morfológicos y bioquímicos característicos de esta forma

de muerte celular. Las aberraciones en este proceso, que conllevan una reducción de la muerte celular, podrían participar en la carcinogénesis favoreciendo la aparición de mutaciones transformantes.¹⁷⁰

El descubrimiento de una variedad de cambios genéticos, que influyen en la apoptosis y aparecen en neoplasias benignas y malignas, apoya a la teoría de que las aberraciones en la apoptosis contribuyen a la transformación neoplásica.^{168,171}

Esto se demuestra por la alta frecuencia en que mutaciones que afectan al gen supresor de tumores *P53* o al oncogen *BCL-2* y otros miembros de la familia *BCL-2* en diversos tipos de cáncer.^{169, 172} Evidencias más directas del papel crítico de la desregulación de la apoptosis en ciertos tipos de cánceres se obtuvieron de experimentos que demuestran que la inhibición de la apoptosis (p.ej., en células transferidas con Bcl-2 o en ratones transgénicos con sobreexpresión de Bcl-2) se relaciona con la adquisición de un fenotipo maligno, mientras la restauración de los defectos en el mecanismo apoptótico (p. ej., a través de transferencia de la p53 salvaje) previene o revierte el crecimiento maligno y su progresión.^{168, 173}

El CCEO ha sido correlacionado con la desregulación del proceso apoptótico.^{86, 128, 173, 174, 175} Se ha sugerido que la carcinogénesis oral se correlaciona con la acumulación progresiva de alteraciones genéticas en las moléculas que juegan un papel crucial durante la apoptosis.^{175, 176} La presencia de cambios en lesiones premalignas de la mucosa oral sugiere el papel significativo de las desviaciones de la apoptosis durante los pasos iniciales de la transformación maligna. Por ejemplo, miembros de la familia Bcl-2 y Bax se expresan diferentemente en el epitelio oral normal, displasia epitelial y en el CCEO.^{175, 177} Además, una relación baja entre Bcl-2/Bax, y por lo tanto proapoptótica, ha sido demostrada con o un indicador de un pronóstico favorable en el CCE de lengua.^{175, 178}

Parece convincente que durante el proceso en múltiples pasos de la carcinogénesis, la acumulación de daños genéticos resultan en la pérdida del control de la proliferación celular, así el mantenimiento del equilibrio entre la proliferación y la muerte celular depende de la eliminación apoptótica de células con una proliferación anormal¹⁷³. En este contexto, el déficit en las vías apoptóticas en la displasia y en el

cáncer oral dan lugar a tasas de apoptosis, aunque aumentadas en relación al epitelio normal, insuficientes para compensar la proliferación celular acelerada y a la acumulación de células dañadas genéticamente, permitiendo así el crecimiento incontrolado, la adquisición de mutaciones adicionales y la progresión de la enfermedad.¹⁷³

La identificación de reguladores de la apoptosis, los cuales poseen potencial de influenciar el balance entre muerte y viabilidad celular, ha ganado especial interés en el entendimiento de la carcinogénesis.

II.2.E.a. Bcl-2

El protooncogen *BCL-2*, localizado en el cromosoma 18, fue el primer gen anti-apoptótico descrito¹⁷⁹ y está involucrado en la regulación de la apoptosis controlada por la p53, demostrando una relación inversa con la expresión de p53.¹⁸⁰

La pieza central del programa apoptótico y el efector principal de la muerte celular programada es la familia de proteínas relacionadas con la Bcl-2. El miembro principal de esta familia es la proteína Bcl-2. Todas las proteínas de esta familia exhiben dos dominios, Bh1 y Bh2, que regulan la formación de dímeros entre los antagonistas (Bcl-2 y Bcl-xi) y los agonistas de la apoptosis (Bax).¹⁸¹ La actividad de esta familia de proteínas se regula en función de la competencia entre dímeros pro-apoptóticos y anti-apoptóticos. Así, si el nivel de Bcl-2 (anti-apoptótico) es mayor que el de Bax (inductor de la apoptosis), los homodímeros Bcl-2/Bcl-2 prevalecen y las células estarán protegidas de la muerte celular programada. Si, por el contrario, Bax está en exceso, se favorece la formación de heterodímeros Bcl-2/ Bax y se induce la apoptosis. Por tanto la relación (nivel relativo de expresión) entre las proteínas inductoras y protectoras de apoptosis determina el destino final de la célula.¹⁸²

Se ha demostrado una reducción de la expresión de la Bcl-2 en el CCEO en comparación con la mucosa oral normal, así como la correlación entre la expresión de Bax y el grado histológico¹⁸³.

En otro estudio, se ha demostrado que la expresión de Bcl-2 y el índice de apoptosis no poseen un valor pronóstico significativo en una serie de 57 pacientes con

CCEO. Sin embargo el aumento de la expresión de Bax se correlacionó con un pronóstico desfavorable.¹⁸⁴

En resumen, la disminución de la expresión de Bcl-2 en queratinocitos humanos premalignos y malignos sugiere que, probablemente, la expresión preferente de miembros de la familia Bcl-2 que protegen de la apoptosis es un fenómeno clave precoz en el desarrollo de CCEO,¹⁸⁵ haciendo sensibles las células a la aparición de mutaciones y a la progresión tumoral. En condiciones normales, el proceso de apoptosis elimina eficazmente a las células genéticamente dañadas y evita su crecimiento y progresión hacia la malignidad. Si este proceso falla, pueden sobrevivir células con ADN lesionado desarrollando una hiperrespuesta a señales de proliferación. Esta continua persistencia de células resistentes a la apoptosis aumenta la posibilidad de que acontezcan mutaciones adicionales que concluyan finalmente en el fenotipo maligno.

II.2.E.b. Survivina

Además de las moléculas Bcl-2, pro y anti apoptóticas, una segunda familia de genes inhibidores de la apoptosis (IAP) ha sido identificada.¹⁸⁶ La survivina, una proteína anti-apoptótica,¹⁸⁷ es indetectable en la mayoría de los tejidos normales en los adultos, mientras su expresión en tumores humanos ha sido relacionada con un aumento de la agresividad tumoral y una disminución de las tasas de supervivencia de los pacientes con cáncer. Existen evidencias de que la inhibición de la apoptosis por la survivina es un parámetro predictivo de un mal pronóstico en cánceres humanos y que la survivina puede ser una diana diagnóstica y terapéutica en tumores malignos.¹⁸⁸

Tanaka et al.¹⁸⁹ han estudiado la expresión de survivina en el CCEO. En este estudio, los autores han demostrado la ausencia o una débil expresión de la survivina en la mucosa oral normal. El 58% de los CCEO presentaron inmunorreactividad para la survivina en el citoplasma de las células tumorales. Sin embargo, no se han encontrado relaciones significativas entre la expresión de survivina y las características clínico-patológicas de las lesiones. En este mismo estudio, los autores encontraron que el 37% de las leucoplasias presentaron expresión de survivina. Los niveles de survivina en las leucoplasia y en las lesiones malignas fueron significativamente más altos que los

encontrados en la mucosa oral normal. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión entre las leucoplasias y los CCEO.

Lo Muzio et al.¹⁹⁰ han investigado el potencial predictivo de la expresión de survivina para identificar las lesiones premalignas (con displasia epitelial) con mayor riesgo de transformación maligna. La expresión de survivina en el tejido oral normal apareció esporádicamente en las capas basal y suprabasal, con una tinción débil. Sin embargo, el 94% de las lesiones premalignas que progresaron hacia un carcinoma presentaron expresión de survivina, mientras que sólo el 33% de las lesiones donde no se observó la transformación maligna presentaron positividad. No se encontró correlación entre la expresión de survivina y el grado de displasia epitelial. El 100% de los CCEO presentaron positividad para la survivina.¹⁹⁰

II.2.F. Angiogénesis

El crecimiento tumoral está asociado con una actividad celular elevada donde el aumento del soporte sanguíneo es crucial para la continuación de su desarrollo. El proceso de angiogénesis es un proceso de múltiples pasos que parecen estar regulados tanto por factores estimulantes como por factores inhibidores. Los pasos críticos para la neovascularización incluyen la degradación de la matriz extracelular, proliferación de células endoteliales, migración y remodelación de la matriz extracelular. Se ha asociado la angiogénesis con la aparición de metástasis y una disminución de la supervivencia de pacientes con varios tipos de tumores, incluyendo el CCEO.

Aunque la valoración directa de la angiogénesis en los cortes histológicos es un procedimiento difícil, se ha sugerido que la cuantificación de microvasos teñidos inmunohistoquímicamente (microdensidad vascular) puede ser utilizada como índice.¹⁹¹ Desafortunadamente, diversos estudios han utilizado anticuerpos distintos para identificar los vasos sanguíneos, lo que hace que la comparación de los resultados sea problemática.

II.2.F.a. Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)

Dentro de los factores angiogénicos, el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) tiene un papel destacado. El VEGF induce la proliferación, diferenciación y migración de las células vasculares endoteliales, aumenta la permeabilidad de los vasos capilares,¹⁹² y también aumenta la supervivencia de las células endoteliales previniendo la apoptosis.¹⁹³ Algunos estudios han demostrado que la expresión de VEGF es un factor pronóstico independiente en pacientes con cáncer de mama,¹⁹⁴ colon¹⁹⁵ y esófago.¹⁹⁶ Sin embargo, pocos estudios han investigado la correlación entre la expresión de VEGF y el pronóstico en pacientes con CCEO.

Uehara et al.¹⁹⁷ no encontraron correlación entre la expresión de VEGF y las metástasis ganglionares en los pacientes con CCEO, pero los tumores con un pronóstico desfavorable presentaron una expresión más alta de VEGF. Moriyama et al.¹⁹⁸ encontraron relación entre la expresión de VEGF y las metástasis cervicales en una serie de 44 pacientes con CCEO. El VEGF parece estar involucrado en el proceso de angiogénesis en el cáncer oral, pero su papel como marcador pronóstico aún no está definido.¹⁹⁹ El aumento de la vascularización en los tejidos malignos puede proporcionar una base para una terapia anti-angiogénesis dirigida contra las células tumorales.

II.2.G. Invasión y Metástasis

El CCEO se caracteriza por su alto grado de invasividad local así como por su alta tendencia a producir metástasis a los ganglios linfáticos cervicales,²⁰⁰ y consecuentemente altas tasas de recidiva local y regional.

El mecanismo de invasión y metástasis es complejo y consiste en múltiples pasos secuenciales.²⁰¹ Para llevar a cabo el proceso de invasión y metástasis las células neoplásicas deben desprenderse del tumor primario e invadir la matriz extracelular. En este primer paso, la pérdida de adhesión intracelular y entre célula y matriz extracelular son requisitos para la progresión tumoral. Estudios recientes sugieren que la expresión aberrante de moléculas de adhesión intercelular, como la cadherina-E, y moléculas de adhesión entre célula y matriz extracelular, como laminina 5 γ 2, se relacionan con el

comportamiento biológico del tumor a través de la adquisición de un fenotipo invasivo, pudiendo ser útiles para la determinación del pronóstico de los pacientes.

Las moléculas de adhesión regulan el crecimiento y diferenciación de las células epiteliales y juegan un importante papel en el mantenimiento de la integridad estructural y la organización del epitelio escamoso estratificado. La reducción de la integridad de la adhesión intercelular ha sido implicada en la pérdida de diferenciación celular, acompañada por una mayor movilidad e invasividad de las células epiteliales neoplásicas en diversos carcinomas humanos.²⁰²

II.2.G.a.Laminina 5 γ 2

Las lamininas son una gran familia de glicoproteínas de la membrana basal y poseen múltiples funciones biológicas entre las cuales se incluyen la adhesión, dispersión y migración celular, así como la proliferación y diferenciación celular.²⁰³

Estructuralmente, las lamininas están compuestas por una cadena α , una cadena β y una cadena γ de proteínas heterodiméricas.²⁰⁴ En la actualidad se sabe que las combinaciones entre estas subunidades forman una gran variedad de distintas isoformas. La actividad biológica específica de las distintas lamininas se debe a que estas moléculas presentan especificidad de expresión para cada tipo de tejido. La laminina 5, que consta de las cadenas α 3, β 3 y γ 2, se sintetiza inicialmente como un precursor de 460 kDa, que sufre un procesamiento proteolítico específico, convirtiéndose en una forma más pequeña tras su secreción en la matriz extracelular. La cadena γ 2 de la laminina 5 es una isoforma singular, ya que su expresión se limita a los tejidos epiteliales, donde forma parte del sistema de anclaje epitelial, así como de la locomoción celular. La cadena γ 2 de la laminina 5 es esencial para la adhesión de los queratinocitos basales a la membrana basal subyacente, y actúa como ligando de adhesión para las integrinas α 3 β 1, α 6 β 1 y α 6 β 4 α 2 β 1.²⁰⁵

Los datos acumulados sugieren que en una serie de diferentes carcinomas humanos se produce un aumento de la expresión de laminina 5 γ 2, y que su expresión es característica de células cancerosas con un fenotipo celular invasivo. Varios estudios indican que la expresión de la proteína laminina 5 γ 2 puede servir de marcador de

cáncer invasivo en diversos tipos de carcinomas de células escamosas. Se ha sugerido que la expresión de laminina 5 γ 2 secretada por las células tumorales contribuye a la invasión de las células neoplásicas estimulando la motilidad celular.²⁰⁶ Estudios experimentales han demostrado que la laminina 5 γ 2 promueve la dispersión celular cuando es añadida a cultivos de células epiteliales.^{207, 208}

La expresión preferencial de laminina 5 γ 2 en el frente de invasión tumoral, zona en la cual las células tumorales presentan un fenotipo más agresivo,²⁰⁹ indica la posibilidad de que esta molécula sea utilizada como marcador de progresión y malignidad en diversos tipos de cáncer de origen epitelial²¹⁰. En el frente de invasión, es frecuente que el tumor presente un menor grado de diferenciación y mayor disociación celular.²¹¹ La expresión de laminina 5 γ 2 en el frente de invasión ha sido estudiada en diversos tipos de cáncer y se ha asociado con recidivas y un pronóstico desfavorable en el CCE de esófago,²¹² colon,²¹³ y adenocarcinomas de pulmón.²¹⁴

Nordemar et al.²¹⁵ estudiaron la expresión de laminina 5 γ 2 en lesiones premalignas que posteriormente se transformaron o no en un CCEO. Los autores encontraron una expresión positiva en el 60% de las lesiones que sufrieron transformación en comparación con el 23% en lesiones que no sufrieron transformación. Basados en estos resultados, los autores concluyen que las lesiones premalignas con expresión de laminina 5 γ 2 poseen un alto riesgo de sufrir transformación maligna.

Hasta la fecha, existen pocos estudios que sobre la relación entre la expresión de laminina 5 γ 2 y el pronóstico de los pacientes con CCEO, y la mayoría se refieren solamente a CCE de localización lingual.

Ono et al.²¹⁶ demostraron que el aumento de la expresión de laminina 5 γ 2 en CCE de lengua, la cual refleja un potencial altamente invasivo de las células cancerígenas, es un factor indicativo de un pronóstico desfavorable. En un estudio posterior, sobre un número mayor de pacientes, los autores confirmaron estos hallazgos iniciales.²¹⁷

Recientemente, Stoltzfus et al.²¹⁸ encontraron que la expresión de laminina 5 γ 2 es un factor predictivo de la recidiva en CCE de lengua en estadio I tratados únicamente con cirugía.

II.2.G.b. Cadherina-E

Las cadherinas son una familia de glicoproteínas de la superficie celular que actúan como moléculas de adhesión intercelular a través de las uniones dependientes de calcio (Ca^{2+}). Las cadherinas clásicas fueron originalmente descritas por su especificidad en determinados tejidos, cadherina-E (epitelial), cadherina-N (neural), y cadherina-P (placentaria), y han sido utilizadas como marcadores en la identificación de tejidos normales y neoplásicos. Estas cadherinas contienen un segmento extracelular relativamente grande (consta de cuatro dominios), un segmento único transmembrana y un dominio citoplasmático también único.²¹⁹

La cadherina-E es una glicoproteína transmembrana de 124 kDa, codificada por el gen *CDH1/cadherina-E*, localizado en el cromosoma 16q22.1.¹²²

La cadherina-E es una molécula clave en el mantenimiento de la adhesión intercelular. Los dominios extracelulares de la cadherina-E de las células vecinas se unen entre sí manteniendo las células en conjunto. Esta función adhesiva de la cadherina-E depende principalmente de la asociación con proteínas citoplasmáticas, llamadas cateninas, que unen la cadherina-E al citoesqueleto celular.²²⁰ Las cateninas son una familia de proteínas que incluyen las cateninas α , β y γ . El dominio citoplasmático de la cadherina-E se une directamente a las cateninas β y γ , mientras la catenina α une el complejo cadherina-E/cateninas β y γ al citoesqueleto de actina.²²¹

La cadherina-E participa también en la mediación de los mecanismos de transducción de señales que controlan fenómenos celulares, que incluyen la polaridad, diferenciación, crecimiento y migración celular.²²²

En el epitelio oral normal o hiperplásico, la cadherina-E se expresa en la zona inferior del estrato espinoso y en la capa basal,²²³ excepto en la superficie basal de las células basales.²²⁴

La infra-regulación de la adhesión celular mediada por la cadherina-E ha sido asociada con la progresión de diversos tumores malignos humanos,^{225, 226} incluyendo el cáncer de cabeza y cuello^{227, 228} y el cáncer oral.²²⁹ La pérdida de la expresión de cadherina-E ha sido asociada con un aumento de la invasividad, estadios T y N avanzados y con un pronóstico desfavorable.^{229, 230} La expresión anormal de cadherina-E parece ser causada por múltiples mecanismos, incluyendo la pérdida de heterocigosidad en el locus *CDH1*, y mutaciones somáticas. El silenciamiento transcripcional por hipermetilación de las islas CpG en las región promotora también ha sido descrita en diversos tumores y líneas celulares.²³¹

II.3. EPIGENÉTICA DEL CÁNCER ORAL

Aunque la búsqueda de alteraciones genéticas ha ocupado gran parte de la investigación oncológica y ha permitido un mejor conocimiento de la biología del cáncer probando el papel de la genética en el proceso de múltiples pasos de la carcinogénesis, recientemente se ha propuesto una base epigenética para el cáncer. La epigenética se podría definir como un cambio heredable en la expresión genética que no es acompañado por alteraciones en la secuencia del ADN.²³² Una de las características epigenéticas más importantes en la biología del cáncer es la inactivación de genes supresores de tumores por metilación de residuos de citosina en las islas CpG localizadas en sus regiones promotoras. Aunque la metilación sea un evento común en el genoma humano, y entre el 70- 80% de los nucleótidos CpG aparezcan metilados en las células humanas,²³³ un tramo de aproximadamente 1kb de ADN rico en GC, llamado islas CpG, parece estar protegido de esta modificación.

Las alteraciones genéticas y epigenéticas parecen actuar conjuntamente afectando diversas funciones celulares, como la regulación del ciclo celular, reparación de ADN, apoptosis, angiogénesis y adhesión intercelular, en el proceso de crecimiento y progresión tumoral²³⁴. Se demostró que la hipermetilación de islas CpG con la consecuente inactivación de genes supresores de tumores puede proporcionar una ventaja de crecimiento a las células neoplásicas. Además, con la utilización de drogas que inducen la desmetilación del ADN para restablecer la expresión de genes supresores

de tumores y otros genes importantes en la biología del cáncer, se conseguido controlar los tumores experimentalmente.²³²

Hay evidencias de que cada tumor humano posee un fenotipo de metilación específico.²³⁵ Se ha identificado que la hipermetilación de genes que regulan la adhesión intercelular (*cadherina-E*), la reparación del ADN (*MGMT*) y el ciclo celular (*P16*) son eventos epigenéticos frecuentes en el CCE de cabeza y cuello.²³⁴ Aunque los estudios en CCEO sean limitados, la hipermetilación de los genes *MGMT*, *cadherina-E* y *P16*, ocurre en el 41%, 35%, y 23%, respectivamente.²³⁶ La hipermetilación del gen *P16* ha sido también descrita en la mucosa oral normal de fumadores²³⁷ y en lesiones displásicas de la cavidad oral, lo que sugiere que éste es un fenómeno precoz en la carcinogénesis oral.²³⁸

La utilización de la metilación de las islas CpG localizadas en las regiones promotoras, como marcador o diana molecular, abre nuevas áreas de investigación con aplicación en la detección precoz, predicción del comportamiento y pronóstico, clasificación epigenética, y terapia del cáncer.²³⁴ El mejor conocimiento de estas alteraciones ha proporcionado un nuevo campo de investigación en la terapéutica del cáncer. El perfil de metilación de los tumores puede ser utilizado como una diana terapéutica para la investigación de drogas que reviertan este proceso y reestablezcan la expresión de genes supresores de tumores silenciados por metilación.²³⁹

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III.1. SELECCIÓN DE LOS PACIENTES

Se han estudiado retrospectivamente las historias clínicas de los pacientes diagnosticados y tratados de CCEO en el Servicio de Cirugía Maxilofacial del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela, entre los años 1995 y 2000. Debido a la ausencia de un registro de tumores, los casos fueron localizados en el registro de ingresos a quirófano para tratamiento quirúrgico de un carcinoma de células escamosas en el Servicio de Cirugía Maxilofacial durante este periodo. Seguidamente, se procedió a la revisión de las historias clínicas en el Archivo Central del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela .

III.1.A. Criterios de inclusión y exclusión

Según los criterios de inclusión se seleccionaron todos aquellos pacientes que hubiesen sido tratados quirúrgicamente de un CCEO con un periodo de seguimiento mínimo de 3 años, salvo que hubiese fallecido a causa de la enfermedad durante este seguimiento. Se incluyeron las lesiones asentadas en las siguientes localizaciones consignadas en la 9ª revisión del Código Internacional de Enfermedades:²⁴⁰ 141.1-141.4, 141.8 y 141.9, porción móvil de la lengua; 143.0-143.9, encía en todas sus localizaciones; 144.0-144.9 suelo de boca todas sus localizaciones; 145.0-145.9 otras localizaciones cavidad oral (mucosa yugal, vestíbulo, paladar duro y trigono retromolar).

Se excluyeron aquellos pacientes que hubiesen recibido tratamiento con radio o quimioterapia anteriormente al tratamiento quirúrgico. Además, se excluyeron los pacientes con metástasis a distancia en el momento del diagnóstico.

III.2. DATOS CLÍNICOS

De cada historia clínica se obtuvieron los siguientes datos clínicos: edad, sexo, historia de los hábitos tabáquicos y alcohólicos, localización, estadio clínico, clasificación TNM, tratamiento de la lesión primaria, presencia o ausencia de recidiva, aparición de segundos tumores primarios, metástasis a distancia, intervalo libre de enfermedad y supervivencia a la enfermedad (APÉNDICE 1).

El estadio tumoral fue clasificado según la 5ª edición del Manual de Estadaje del Cáncer del AJCC ³⁶ (ver página 18).

III.2.A. Factores de riesgo

III.2.A.a. Tabaco

Se registró el consumo de tabaco según la cantidad de cigarrillos consumida diariamente y los pacientes fueron agrupados de forma semi-cuantitativa en:

- fumador leve (menos de 10 cigarrillos/día)
- fumador moderado (entre 10 y 20 cigarrillos/día)
- fumador importante (más de 20 cigarrillos/día)
- no fumador
- desconocido

III.2.A.b. Alcohol

El consumo de alcohol se registró semi-cuantitativamente, según la cantidad en gramos consumida diariamente, y los pacientes fueron clasificados en:

- bebedor leve (menos de 40 g/día)
- bebedor moderado (entre 40 y 80 g/día)
- bebedor importante (más de 80 g/día)
- no bebedor
- desconocido

III.2.B. Evolución de la enfermedad

La zona de recidiva fue definida como local (localización primaria) o regional (nódulos linfáticos cervicales), segundo tumor primario, o metástasis a distancia. Las metástasis cervicales tardías, y recidivas de las metástasis cervicales fueron identificadas como recidivas regionales. Las metástasis a distancia se definieron como

la diseminación tumoral a partir del tumor primario hacia órganos o nódulos linfáticos a distancia.²⁴²

El intervalo libre de enfermedad fue medido desde la fecha del tratamiento inicial hasta la fecha del diagnóstico de la recidiva local, regional o a distancia.

III.2.C. Evolución del paciente

La supervivencia fue definida como el intervalo entre el inicio del tratamiento y la fecha de la muerte o la fecha del último control para los casos censurados.

III.3. ESTUDIO HISTOLÓGICO CONVENCIONAL

Las muestras histológicas fueron obtenidas del Servicio de Anatomía Patológica del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela. Las piezas quirúrgicas fueron fijadas en formol tamponado al 10%, por un máximo de 24 horas, e incluidas en parafina. Tras el estudio con técnicas habituales de hematoxilina-eosina, se seleccionaron los bloques más representativos de los tumores y se realizaron nuevos cortes de 5 micras para el estudio histológico e inmunohistoquímico.

III.3.A. Grado de diferenciación histológica

La diferenciación histológica fue definida según los criterios de la OMS²⁶ en tumores bien diferenciados, moderadamente diferenciados y pobremente diferenciados. Todas las muestras fueron clasificadas por el mismo observador.

III.3.B. Modo de Invasión Tumoral

El modo de invasión tumoral se clasificó en 4 categorías:³²

- A) Tumor con márgenes invasivos bien delimitados que empujan el tejido adyacente.
- B) Tumor con márgenes que infiltran el tejido adyacente en cordones sólidos.

C) Tumor con márgenes que contienen pequeños grupos o cordones de células infiltrantes (> 15 células tumorales).

D) Tumores con marcada disociación celular en pequeños grupos celulares o incluso células individuales (< 15 células tumorales).

Para el análisis de los resultados se agruparon las categorías A y B (poco invasivos) y C y D (muy invasivos).

III.3.C. Profundidad de Invasión Tumoral

Para la medición de la profundidad máxima de los tumores se seleccionaron los cortes con el máximo grosor en los cuales se podía observar la mucosa adyacente y que se consideraron que no fueron cortados tangencialmente. Para la medición se utilizó una rejilla micrométrica (Graticules Ltd., Tombridge, Reino Unido) para medir la distancia, en milímetros, a partir de una línea imaginaria reconstruyendo la membrana basal de la mucosa oral sana hasta el punto de invasión máximo del tumor, tanto en lesiones exofíticas como ulceradas.²⁴¹

III.3.D. Invasión perineural

La invasión perineural fue positiva cuando se identificaron células tumorales en el espacio perineural. Los tumores adyacentes a los nervios sin penetrar en el espacio perineural no fueron considerados positivos para la invasión perineural.²⁴²

II.3.D. Estado de los márgenes quirúrgicos

Para la definición del estado de los márgenes quirúrgicos se han revisado los informes histológicos referentes a la escisión del tumor, así como todos los informes de las biopsias intraoperatorias realizadas durante el acto quirúrgico. Los márgenes quirúrgicos se definieron como libres de infiltración tumoral (márgenes negativos) o con infiltración tumoral (márgenes positivos).

III. 4. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

Para las técnicas inmunohistoquímicas se utilizó el sistema automático de tinción Techmate 500 (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca):

III.4.A. Preparación de los cortes de parafina

Los cortes de parafina de 5 micras se recogieron en portaobjetos pretratados específicos para su uso en el teñidor Techmate (Dako ChenMate Capillary Gap Microscope, DakoCytomation). Los cortes se dejaron secar durante una noche a 45°C y posteriormente fueron desparafinados e hidratados.

III.4.B. Recuperación Antigénica

Según el anticuerpo primario utilizado, las muestras fueron sometidas a distintos métodos de recuperación antigénica.

III.4.B.a. Ki-67/MIB-1 y Laminina 5 γ 2

Método de recuperación antigénica en baño termostático húmedo a 99°C durante 40 minutos, en una solución de recuperación antigénica Tris-EDTA, pH 9 (Target Retrieval Solution, S3308, DakoCytomation).

III.4.B.b. EGFR

Recuperación antigénica mediante tratamiento enzimático con Proteinasa K. Las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente durante 5 minutos con Proteinasa K al 0,1% diluida en solución tampón Tris- HCL.

III.4.B.c. Cadherina-E

Pretratamiento en el horno microondas a una potencia de 750 W durante 20 minutos, en solución tampón citrato, pH 6 (Target Retrieval Solution, S2031, DakoCytomation).

III.4.C. Técnica inmunohistoquímica

Tras enfriar las secciones durante 20 minutos, éstas fueron introducidas en los contenedores especiales del teñidor automático TechMate 500 (DakoCytomation), el cual realizó la técnica inmunohistoquímica siguiendo los siguientes pasos:

1. Lavado PBS
2. Incubación con anticuerpos primarios a temperatura ambiente durante 30 minutos: Anticuerpo monoclonal anti-Ki-67, dilución 1/10 (clon MIB-1, DakoCytomation); anticuerpo monoclonal anti-EGFR prediluido (clon 2-18C9, DakoCytomation); anticuerpo monoclonal anti-Laminina 5 γ 2, dilución 1/10 (clon 2-18C9 , DakoCytomation); y anticuerpo monoclonal anti-cadherina-E, dilución de 1/100 (clon 36, Transduction Laboratories, Lexington, Kentucky, EUA). (Tabla 6).
3. Lavado PBS
4. Bloqueo peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3% durante 5 minutos.
5. Lavado PBS
6. Incubación con sistema de polímeros de dextrano durante 30 minutos. (EnVision™ Detection Kit,DakoCytomation). El sistema de polímeros de dextrano se basa en la utilización de un polímero de alto peso molecular, al que se conjugan covalentemente un gran número de moléculas de peroxidasa y anticuerpo secundario (inmunoglobulinas anti ratón/conejo) (Figura 1).
7. Lavado PBS
8. La visualización del marcaje inmunohistoquímico se realizó con tetraclorhidrato de diaminobencidina (DakoCytomation).
9. Contraintinción con Hematoxilina de Harris durante 2 minutos.
10. Lavado PBS
11. Deshidratación y montaje.

Se incluyeron controles negativos y positivos para asegurar la especificidad de la técnica.

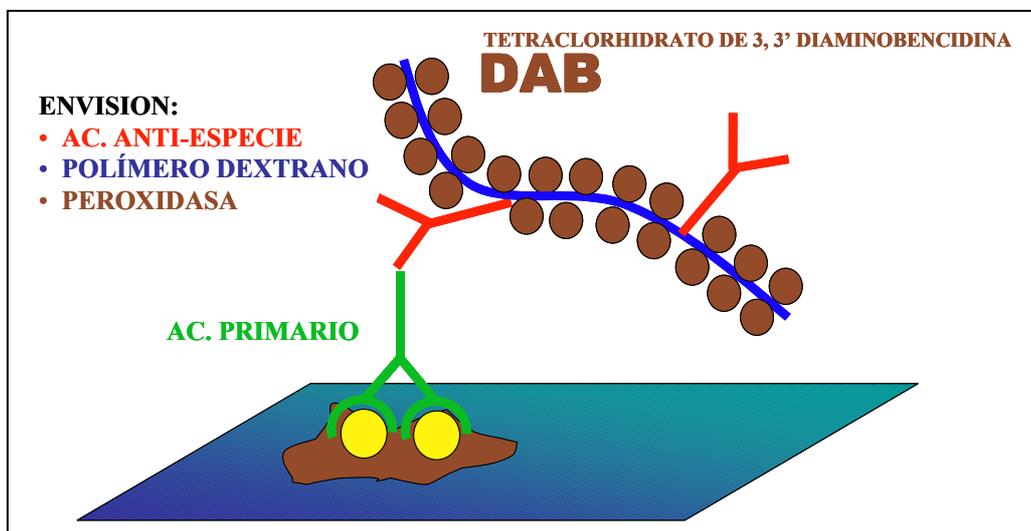


Figura 1: Técnica inmunohistoquímica: sistema de polímeros de dextrano

Anticuerpo	Clon	Dilución	Pretratamiento	Casa Comercial	País
Anti- Ki-67	MIB-1	1/10	BTH + TE	DakoCytomation	Dinamarca
Anti- Laminina 5γ 2	4G1	1/10	BTH+ TE	DakoCytomation	Dinamarca
Anti- EGFR	2-18C9	prediluido	Proteinasa K	DakoCytomation	Dinamarca
Anti- Cadherina-E	36	1/100	HMO	Transduction Laboratories	EUA

BTH: Baño termostático húmedo; TE: Solución Tris-EDTA; PK: Proteinasa K; HMO: Horno Microondas

Tabla 6: Panel de anticuerpos utilizados

III.4.D. Valoración de los marcadores inmunohistoquímicos

III.4.D.a. Cuantificación de la expresión de Ki-67/MIB-1

Para la cuantificación de la expresión del Ki-67 se utilizó el método de conteo de puntos de forma manual mediante una rejilla de Mertz con 36 puntos de corte (Mertz Graticule, Klarman Rulings Inc., Litchfield, Holanda) (Figura 2). Las muestras fueron analizadas a un aumento de 400x (objetivo 40x, ocular 10x). Los puntos de la rejilla se utilizaron para registrar los núcleos MIB-1 -positivos/negativos. De esta manera los puntos de corte pueden ser MIB-1-positivos, MIB-1-negativos o ninguno de los dos. Las células se consideraron positivas si se identificaba tinción positiva en el núcleo o nucleolo, independientemente de la intensidad de tinción. El índice de proliferación celular se definió como $\frac{\text{MIB-1 positivos}}{\text{MIB-1 positivos} + \text{MIB-1 negativos}}$. La cuantificación se realizó en 10-15 campos de visión realizando el recuento de al menos 150 núcleos en cada caso.²⁴³

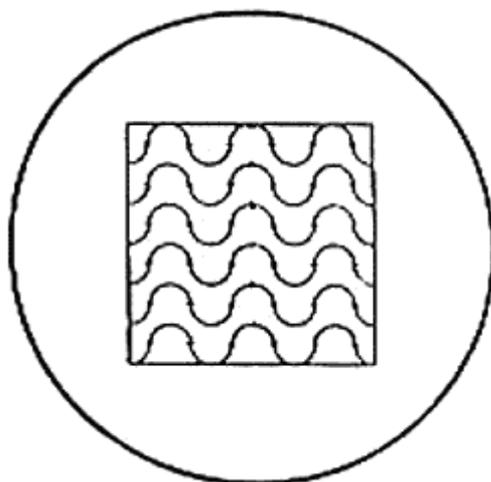


Figura 2: Rejilla de Mertz con 36 puntos de corte usada para la cuantificación del índice de proliferación celular

III.4.D.b Cuantificación de la expresión del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)

La tinción de la membrana fue valorada en las células tumorales y clasificada en 4 grupos diferentes.²⁴⁴

0; Negativo: No se observó tinción, o tinción en la membrana de <10% de las células neoplásicas.

1+; Positivo débil: Tinción de débil intensidad, completa o incompleta de la membrana celular, en >10% de las células neoplásicas.

2+; Positivo moderado: Tinción de moderada intensidad, completa o incompleta de la membrana celular, en >10% de las células neoplásicas.

3+; Positivo intenso: Tinción de fuerte intensidad, completa o incompleta de la membrana celular, en >10% de las células neoplásicas.

Por motivos prácticos y para el análisis estadístico se agruparon los casos 0 y 1+ como expresión negativa/ débil y los casos 2+ y 3+ como expresión moderada/ intensa.

III.4.D.c. Cuantificación de la expresión de Laminina 5 γ 2

La cuantificación de la expresión de la laminina 5 γ 2 fue realizada mediante el método detallado a continuación. Primeramente, los cortes fueron examinados a más baja magnificación para identificar el área con el mayor nivel de expresión, y seguidamente, este área fue examinada a un aumento de 100x (objetivo 10x, ocular x10).

Se han comparado dos sistemas para valorar la expresión de laminina 5 γ 2, uno cualitativo y otro semi-cuantitativo:²¹⁶

- A) Pocas o ningunas células tumorales positivas;
- B) Parte de la periferia de los nidos tumorales es positiva;
- C) La periferia de los nidos tumorales es circunferencialmente positiva;
- D) Prácticamente todas las células tumorales son positivas

Por motivos prácticos y para el análisis estadístico se agruparon los patrones A y B como expresión ausente/débil y los patrones C y D como expresión moderada/intensa.

0; Negativo: Ausencia de expresión en las células tumores

1+; Positivo débil: <30% de las células tumorales positivas;

2+; Positivo moderado: 30-60% de las células tumorales positivas;

3+; Positivo intenso: > 60% de las células tumorales positivas.

III.4.D.d. Cuantificación de la expresión de cadherina-E

La tinción de la membrana de las células tumorales fue valorada semicuantitativamente. La intensidad de expresión fue clasificada en 4 grupos:³¹⁵

0; Negativo: Ausencia de expresión en las células tumorales.

1+; Positivo débil: Expresión débil detectada en <10% de las células tumorales.

2+; Positivo moderado: Expresión moderada o fuerte, focal o heterogénea, en 10-75% de las células tumorales, indicando subpoblaciones inmunopositivas.

3; Positivo intenso: Expresión fuerte y homogénea en >75% de las células tumorales.

Por motivos prácticos y para el análisis estadístico se agruparon los casos según la intensidad de expresión en: grupos 0 y 1+ como expresión negativa/débil y los grupos 2+ y 3+ como expresión moderada/ intensa.

Todas las muestras fueran analizadas a ciegas por un único examinador.

III.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos recogidos fueron introducidos en una base de datos utilizando el software FileMaker Pro 5.5 para Windows (FileMaker Inc., Santa Clara, CA, EEUU). Seguidamente, los datos fueron tabulados y analizados estadísticamente mediante el software SPSS para Windows versión 10.0 (SPSS Inc., Chicago, ILL, EEUU).

Las variables continuas se describen como medias y su desviación estándar. Para analizar las diferencias entre las medias de variables continuas (p.ej. edad, índice de proliferación celular, profundidad de invasión tumoral, etc.) se utilizó la prueba T de Student, en el caso de dos variables, y el análisis de la varianza (ANOVA), en el caso de tres o más variables.

Las variables categóricas se describen en números absolutos y porcentajes. Para contrastar las variables categóricas se utilizó la prueba de Chi-cuadrado o el Test exacto de Fisher.

Se consideraron significativos los valores de probabilidad menores o iguales a 0,05 ($p \leq 0,05$).

El tiempo libre de enfermedad y la supervivencia se representan en medias con sus respectivos intervalos de confianza de 95%. Para variables categóricas, el intervalo libre de enfermedad y la supervivencia fueron estimados mediante el método de Kaplan Meier,²⁴⁵ y se aplicó la prueba de Log Rank para valorar la significación de las diferencias entre las curvas de supervivencia con un intervalo de confianza del 95%. El método de regresión de Cox se utilizó para valorar el intervalo libre de enfermedad y la supervivencia cuando las variables eran continuas. Las variables con significación estadística a nivel del 0,05 en el análisis univariante fueron introducidas en un modelo de regresión multivariante mediante el modelo de riesgo proporcional de Cox.

III.5.A. Representación gráfica de los resultados

La correlación entre dos variables categóricas se representó mediante gráficos de barras con los valores expresados en porcentajes.²⁴⁶

La relación entre una variable categórica y otra numérica continua se representó mediante diagramas de cajas. La caja central indica el rango en el que se concentra el 50% central de los datos. Sus extremos son, por lo tanto, los percentiles 25 y 75% de la distribución. La línea central en la caja es la mediana. Los extremos de los “bigotes” que salen de la caja son los valores que delimitan el 95% central de los datos. Los valores extremos están representados por asteriscos (*) y círculos (°).²⁴⁷

La asociación entre dos variables numéricas continuas se representó mediante diagramas de dispersión.²⁴⁸

La representación gráfica del análisis del intervalo libre de enfermedad y de la supervivencia se realizó mediante curvas de supervivencia.

IV. RESULTADOS

IV.1. SELECCIÓN DE LOS PACIENTES

Se identificaron y revisaron 168 historias clínicas de pacientes ingresados para el tratamiento quirúrgico de un carcinoma de células escamosas del territorio maxilofacial. De éstos, se seleccionaron 89 pacientes que cumplían los criterios de inclusión en relación al diagnóstico de un carcinoma de células escamosas localizados primariamente en la cavidad oral. De los 89 pacientes seleccionados, 36 pacientes fueron excluidos por presentar un seguimiento incompleto o inferior a los 3 años y 6 por haber recibido tratamiento con quimioterapia antes de la extirpación quirúrgica de la lesión. Por lo tanto, el estudio se realizó en una muestra de 47 pacientes diagnosticados de CCEO, tratados primariamente con cirugía, con un seguimiento mínimo de 3 años, salvo que hubiese fallecido a causa de la enfermedad durante este seguimiento. El tiempo de seguimiento medio fue de 37,78 meses \pm 20,09 (rango 6-108 meses).

IV.2. DATOS CLÍNICOS

IV.2.A. Edad y sexo

La edad media de presentación fue de 58,06 \pm 11,40 (rango 39-74). Nueve pacientes (19,1%) presentaban una edad \leq 45 años, y 38 pacientes (80,9%) presentaban una edad $>$ 45 años.

De los 47 pacientes, 39 pacientes (83%) fueron hombres y 8 (17%) mujeres.

IV.2.B. Factores de riesgo

IV.2.B.a. Tabaco

La información respecto al hábito tabáquico constaba en 28 (59,57%) de las historias clínicas. De los pacientes que se conocía el hábito tabáquico, 5 (17,86%) fueron no fumadores, 1 (3,57%) fumador leve, 13 (46,43%) fumadores moderados y 9 (32,14%) fumadores importantes.

IV.2.B.b. Alcohol

La información en relación con el consumo de alcohol constaba en 26 de las historias clínicas (55,21%). De los pacientes que se conocía la cantidad de alcohol consumida diariamente, 5 (19,23%) eran no bebedores, 2 (7,69%) bebedores leves, 10 (38,46%) bebedores moderados y 9 (34,62%) bebedores importantes.

IV.2.C. Localización del tumor primario

Dentro de la localización primaria de las lesiones, los cánceres de lengua fueron los más frecuentes con un total de 18 casos (38,3%), seguidos de los de suelo de boca (n= 13, 27,7%), reborde alveolar (n= 9, 19,1%), trigono retromolar (n= 3, 6,4%), paladar duro (n= 3, 6,4%) y mucosa yugal (n= 1, 2,1%).

LOCALIZACIÓN	Nº DE CASOS	%
Lengua	18	38,3
Suelo de Boca	13	27,7
Reborde Alveolar	9	19,1
Trígono Retromolar	3	6,4
Paladar Duro	3	6,4
Mucosa Yugal	1	2,1

Tabla 7: Localización del tumor primario

IV.2.D. Estadío TNM

Se han clasificado los tumores en función del estadio tumoral en el momento del diagnóstico, siguiendo las directrices del Manual de Estadía del Cáncer de la AJCC.³⁶

IV.2.D.a. Tamaño del tumor primario (T)

Según el tamaño, 18 (38,3%) tumores eran T1, 12 (25,5%) T2, 7 (14,9%) T3 y 10 (21,3%) T4.

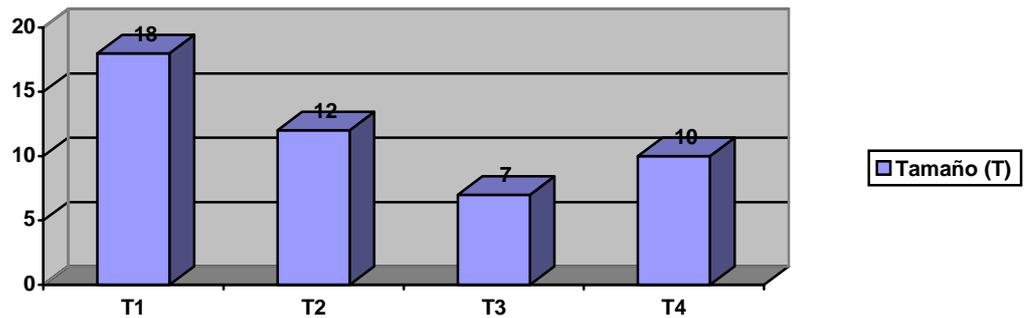


Figura 2: Distribución de los pacientes según el tamaño del tumor primario (estadio T)

II.2.D.b. Ganglios linfáticos cervicales (estadio N)

Respecto a los ganglios linfáticos cervicales, la mayoría de los casos no presentaban adenopatías cervicales palpables ($n= 34$, 72,3%) y los casos con adenopatías palpables se repartían en: 8 (17%) N1 y 5 (10,6%) N2.

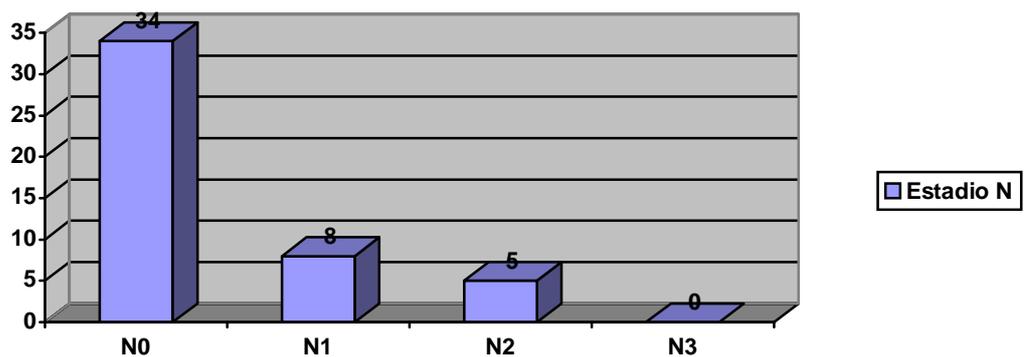


Figura 3: Distribución de los pacientes según la afectación de los ganglios linfáticos cervicales (estadio N)

En el momento del diagnóstico ningún caso presentó metástasis a distancia una vez que este era uno de los criterios de exclusión del estudio.

IV.2.E. Estadio Clínico

Diecisiete pacientes (36,2%) presentaron tumores en estadio I, 10 (21,3%) en estadio II, 9 (19,1%) en estadio III, y 11 (23,4%) en estadio IV. Al agrupar los pacientes con tumores en estadio I-II (estadios tempranos) y III-IV (estadios avanzados), 26

(55,3%) pacientes presentaron tumores en estadios tempranos y 21 (44,7%) en estadios avanzados.

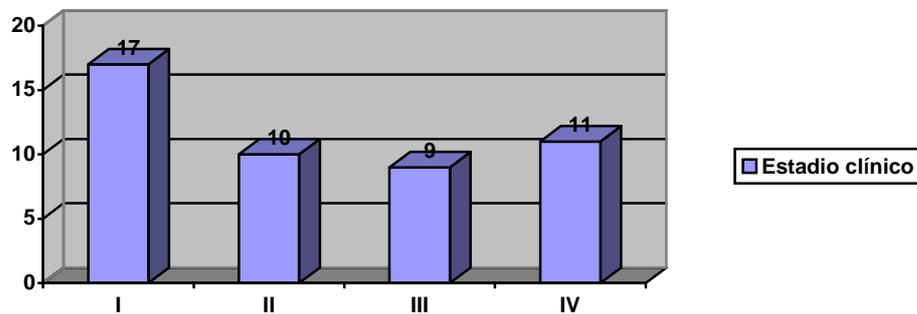


Figura 4: Distribución de los pacientes según el estadio clínico

IV.2.F. Tratamiento

Todos los tumores primarios fueron extirpados quirúrgicamente con intención curativa. En 5 casos (10,6%) el informe histopatológico confirmó la infiltración neoplásica en los bordes quirúrgicos de la resección tumoral.

A los 13 pacientes con adenopatías cervicales palpables se les realizó un vaciamiento cervical terapéutico. En todos los pacientes se obtuvo la confirmación histológica de metástasis ganglionar.

El vaciamiento cervical profiláctico fue realizado en 19/34 pacientes (36,2%) sin adenopatías cervicales palpables. Se confirmó la metástasis ganglionar cervical en uno de estos casos (5,3%).

Por lo tanto, la diseminación regional a los ganglios linfáticos cervicales se confirmó histológicamente en 14 pacientes (29,78).

A los demás 15 pacientes (31,9%), sin adenopatías cervicales palpables, no se les realizó vaciamiento cervical.

En total 12 pacientes (25,5%) recibieron radioterapia postoperatoria directamente a la lesión primaria, cuello o ambos.

IV. 3. EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD

IV.3.A. Recidivas locales

Dieciséis pacientes (34%) presentaron recidiva local durante el intervalo del estudio con un intervalo medio de 13 meses \pm 7,76 (rango 2- 29 meses).

IV.3.B. Recidivas regionales

Veinte dos pacientes (46,8%) presentaron recidivas regionales. La media del intervalo de presentación fue de 15,86 meses \pm 7,16 (rango 5- 34 meses).

IV.3.C. Metástasis a distancia y Segundos tumores primarios

Cinco pacientes (10,63%) presentaron metástasis a distancia, las cinco se localizaron en pulmón. Dos pacientes (4,25%) desarrollaron un segundo tumor primario durante el periodo de seguimiento, los 2 se localizaron en laringe. El intervalo medio de presentación de las metástasis a distancia y segundos tumores primarios fue de 38,42 meses \pm 16,30 (rango 19- 64 meses)

IV.4. EVOLUCIÓN DEL PACIENTE

Al final del estudio, 21 (44,7%) pacientes permanecían vivos, 1 (2,1%) paciente permanecía vivo pero presentaba recidiva local y regional y 25 (53,2%) murieron por la enfermedad. No se han encontrado muertes debido a otras causas durante el periodo de seguimiento.

IV.5. ESTUDIO HISTOLÓGICO

IV.5.A. Grado de Diferenciación Histológica

Según los criterios establecidos por la OMS para la clasificación histológica de los tumores, 22 (46,8%) eran bien diferenciados y 25 (53,2%) moderadamente diferenciados. No se diagnosticaron tumores pobremente diferenciados.

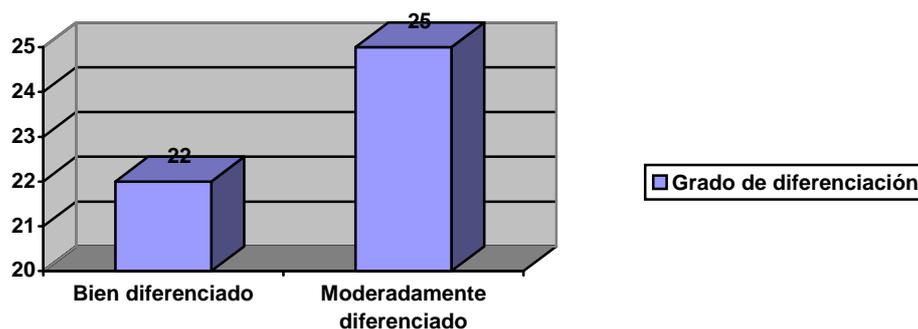


Figura 5: Distribución de los pacientes según el grado de diferenciación histológica

IV.5.B. Modo de Invasión Tumoral

Al clasificar los tumores según el modo de invasión tumoral, 6 (12,8%) presentaron un patrón de invasión A, 19 (40,4%) patrón B, 13 (27,7%) patrón C y 9 (19,1%) patrón D. Al agrupar los pacientes, 25 (53,2%) presentaron tumores poco invasivos (A y B) y 22 (46,8%) tumores muy invasivos (C y D).

Modo de Invasión Tumoral	Poco Invasivos		Muy Invasivos	
	A	B	C	D
Número/ (%)	6 (12,8%)	19 (40,4%)	13 (27,7%)	9 (19,1%)
	25 (53,2%)		22 (46,8%)	

Tabla 8: Distribución de los pacientes según el modo de invasión tumoral

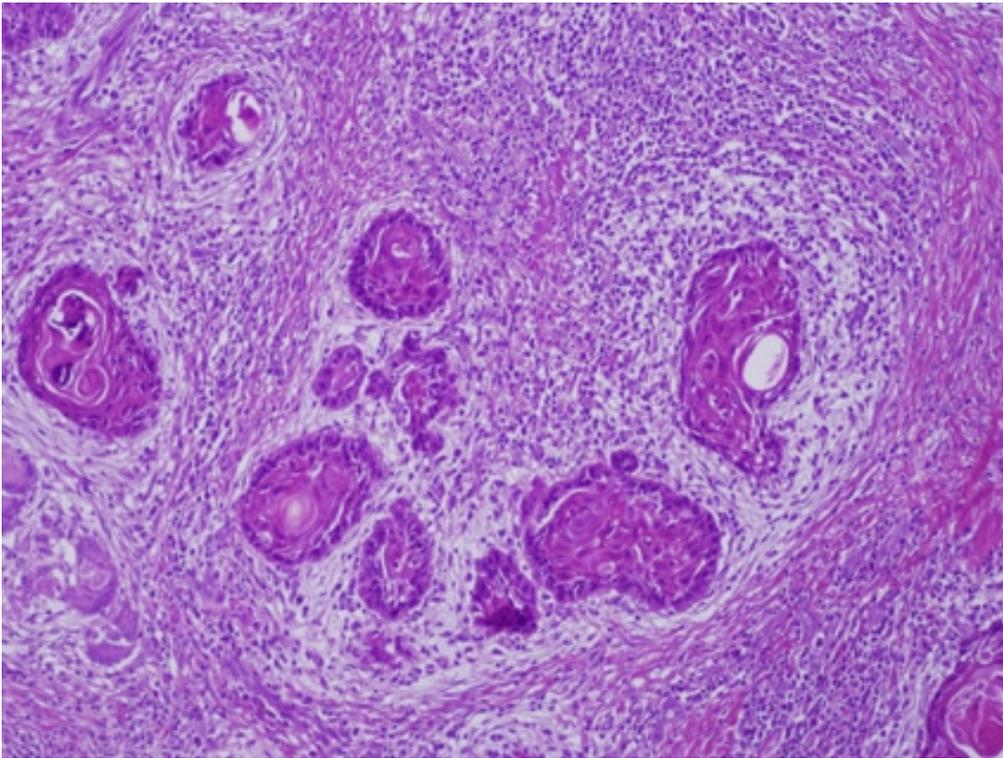


Figura 6: Carcinoma oral de células escamosas que infiltra en forma de nidos (> 15 células tumorales) (H-E 10x).

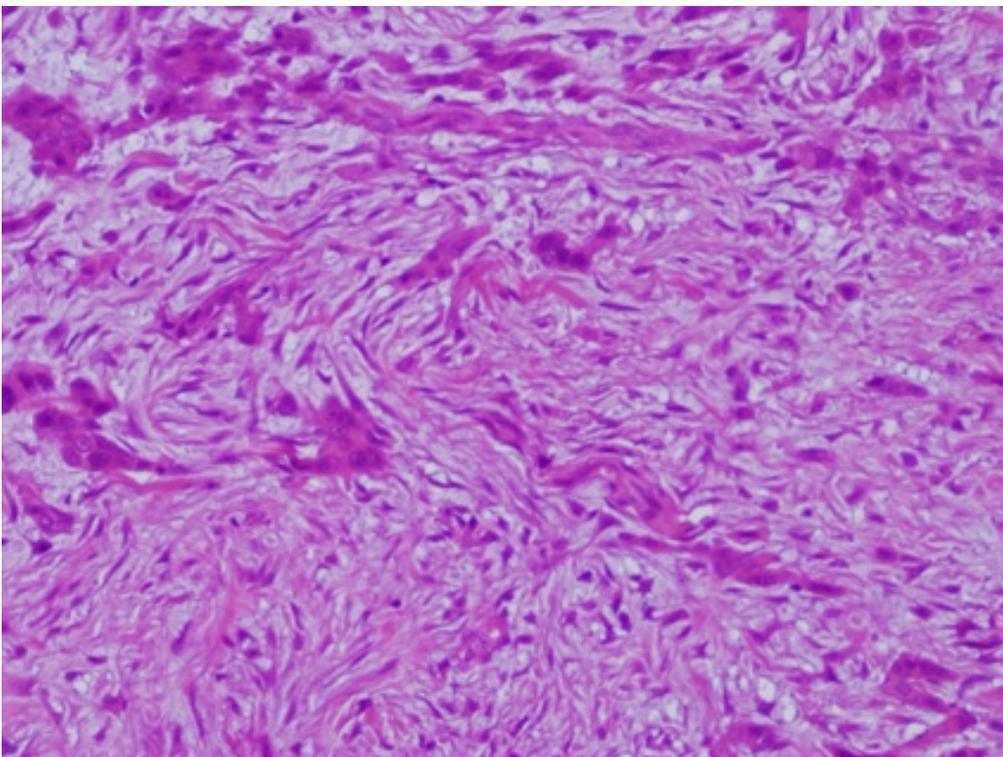


Figura 7: Carcinoma oral de células escamosas que infiltra en forma de pequeños cordones o células individuales (< 15 células tumorales) (H-E 20x).

IV.5.C. Profundidad de Invasión

El grosor de 10 tumores no pudo ser valorado debido a la ausencia de mucosa normal adyacente. La media del grosor de las 37 lesiones restantes fue de 6,33 mm \pm 3,68 (rango 1,25-16,37mm).

	Media	Desviación Típica	Mínimo	Máximo
Profundidad (mm) (n=37)	6,33	3,68	1,25	16,37

Tabla 9: Profundidad de invasión media de los tumores

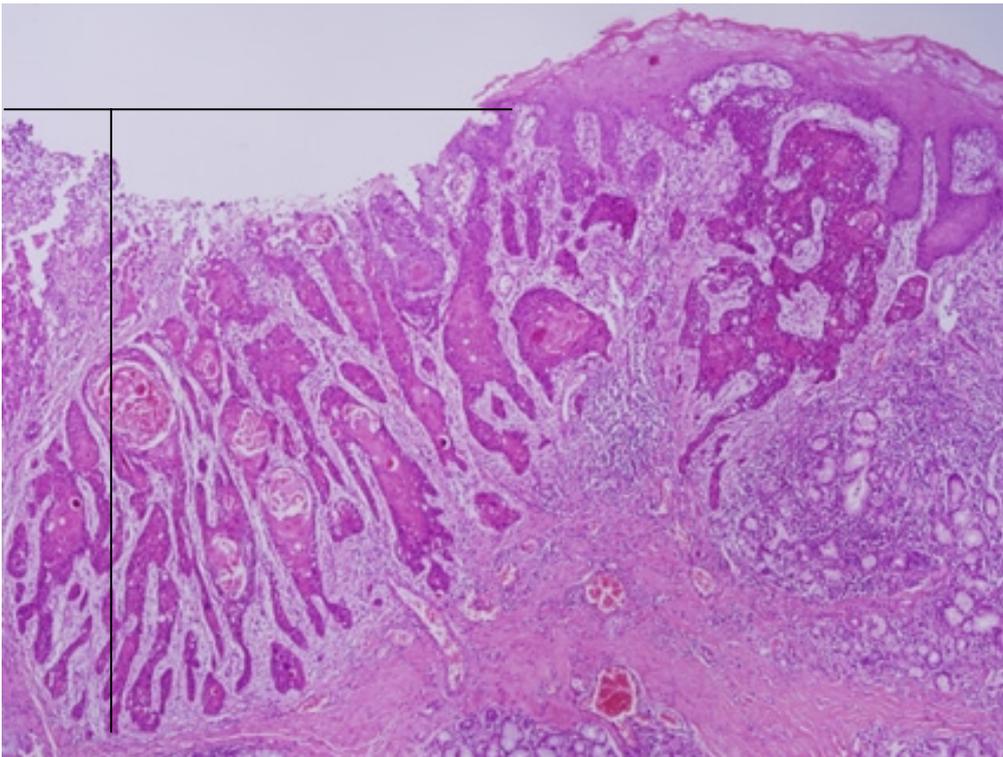


Figura 8: Profundidad de invasión tumoral. Distancia en mm a partir de una línea imaginaria que reconstruye la membrana basal de la mucosa oral hasta el punto de invasión máximo del tumor (H-E 4x).

IV.5.D. Invasión Perineural

La invasión perineural fue observada en 9 (19,14%) de los tumores.

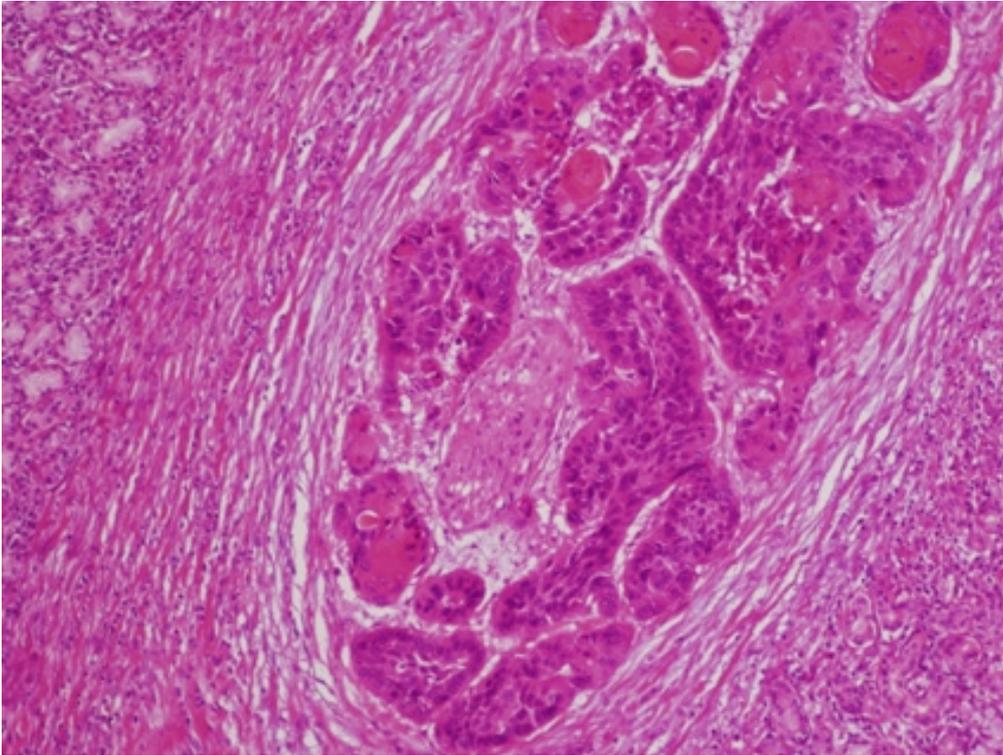


Figura 9: Invasión perineural de las células neoplásicas en el carcinoma oral de células escamosas (H-E 20x).

IV.5.E. Márgenes quirúrgicos

El informe histopatológico final confirmó la infiltración neoplásica en los márgenes quirúrgicos de la resección tumoral en 5 casos (10,6%).

IV.6. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

IV.6.A. Proliferación celular (MIB-1)

Los núcleos positivos fueron identificados por su tinción de color marrón. La distinción entre los núcleos positivos y negativos fue inequívoca. No se observó tinción citoplasmática con excepción de las células en mitosis, que presentaron una tinción nuclear de un marrón más oscuro que los otros núcleos positivos, y el citoplasma presentó una tinción marrón amarillenta.

El tejido normal del margen de las lesiones presentaron un patrón de tinción positiva en las células basales y parabasales. En la mucosa adyacente con displasia, la tinción positiva se extendía hacia las capas celulares más superficiales.

La distribución de los núcleos positivos para MIB-1 en el tumor fue heterogénea, variando desde débil o ausente en las áreas centrales donde se encontraban células maduras o en proceso de queratinización, a una actividad proliferativa más alta en las áreas periféricas. Al contrario, la mayoría o la totalidad de los núcleos en la periferia del frente de invasión tumoral fueron uniformemente positivos. Por lo tanto, esta fue el área establecida para la cuantificación del índice de proliferación celular.

Todas las muestras estudiadas, excepto una, mostraron positividad nuclear para el anticuerpo MIB-1 con un índice de proliferación medio de $57,28\% \pm 16,40$ (rango 23,60-85,32%).

	Media	Desviación Típica	Mínimo	Máximo
MIB-1 (%) (n=46)	57,28	16,40	23,60	85,92

Tabla 10: Índice de proliferación celular medio de los tumores

La distribución de los índices de proliferación del tumor primario según los parámetros clínicos, histológicos e inmunohistoquímicos se pueden observar en la tabla 11.

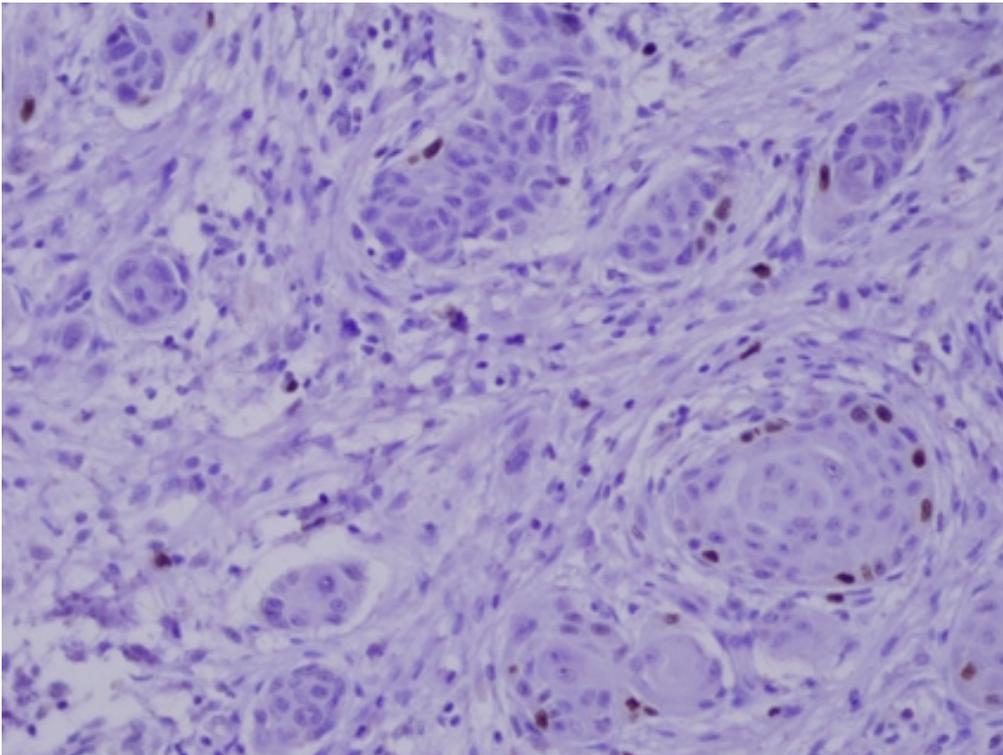


Figura 10: Carcinoma oral de células escamosas con bajo índice de proliferación celular (MIB-1, 20x).

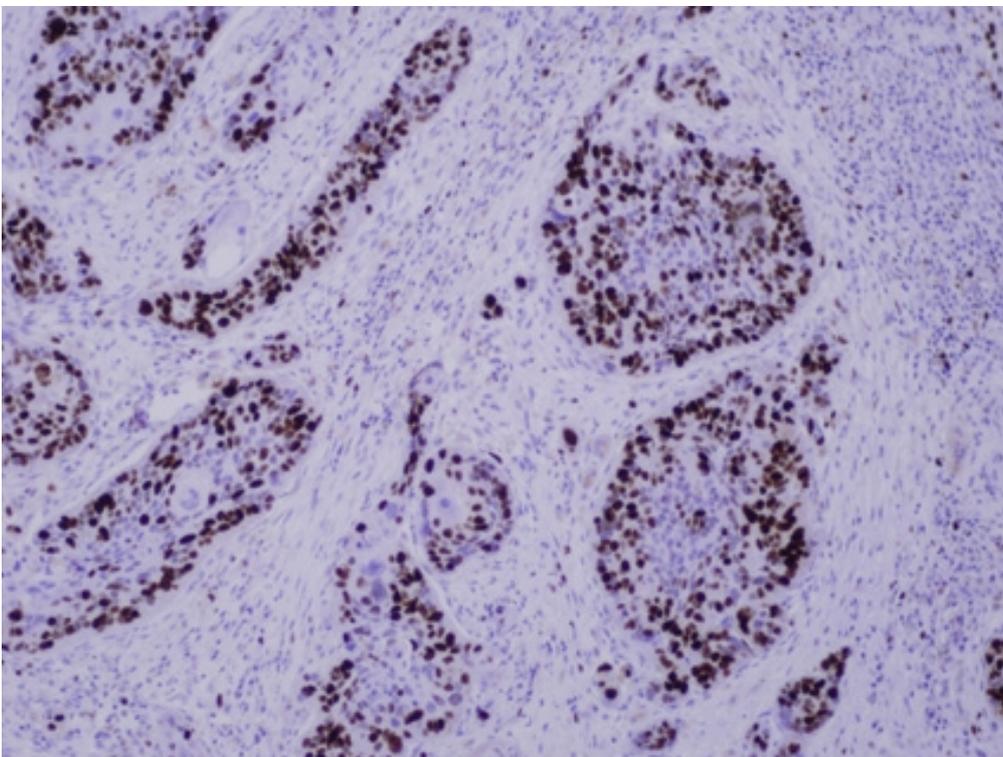


Figura 11: Carcinoma oral de células escamosas con alto índice de proliferación celular (MIB-1, 10x).

IV.6.A.a. Correlación entre MIB-1 y Edad

No existió relación significativa entre la edad del paciente en el momento del diagnóstico y el índice de proliferación celular ($R= 0,038$, $p= 0,804$).

El índice de proliferación de los tumores en pacientes ≤ 45 años fue de $53,42 \pm 13,11$, y de $58,21 \pm 17,13$ en los pacientes > 45 años, esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0,438$; Test T de Student).

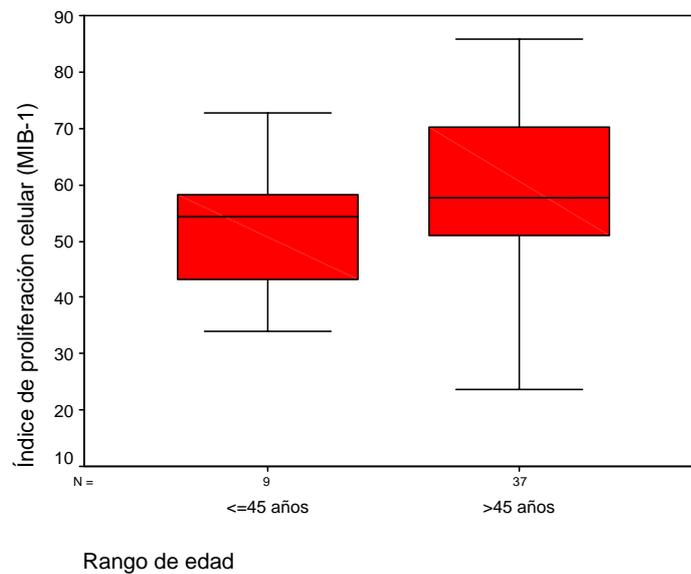


Figura 12: Distribución de MIB-1 según el rango de edad

IV.6.A.b. Correlación entre MIB-1 y Sexo

Respecto a la relación entre el índice de proliferación del tumor y el sexo del paciente, encontramos un índice de proliferación significativamente más alto ($60,15\% \pm 15,54$) entre los hombres en comparación con las mujeres ($41,24\% \pm 11,60$) ($p= 0,04$; T de Student)

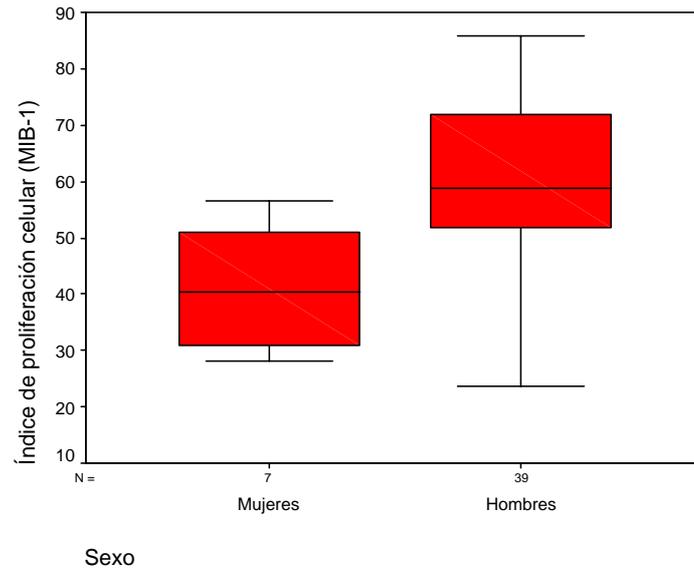


Figura 13: Distribución de MIB-1 según el sexo

IV.6.A.c. Correlación entre MIB-1 y Localización

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el índice de proliferación para las distintas localizaciones. ($p= 0,056$, ANOVA). Aunque el índice de proliferación fue visiblemente más bajo en la lesión localizada en mucosa yugal, probablemente la diferencia no alcanzó significación estadística por tratarse de una única lesión.

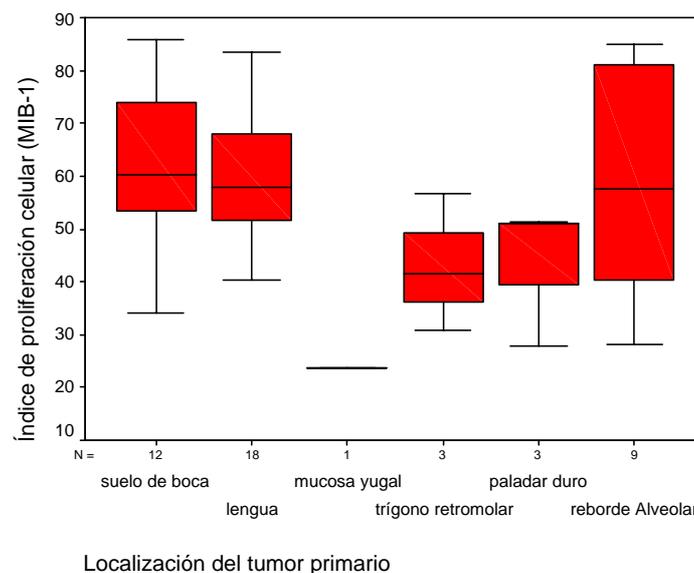


Figura 14: Distribución de MIB-1 según la localización del tumor primario

IV.6.A.d. Correlación entre MIB-1 y Estadío TNM

Tamaño del tumor primario (estadio T)

Al analizar la relación entre el índice de proliferación celular con el tamaño (T) de la lesión primaria observamos una tendencia al incremento de los índices de MIB-1 con el aumento del tamaño del tumor, sin embargo esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0,304$; ANOVA).

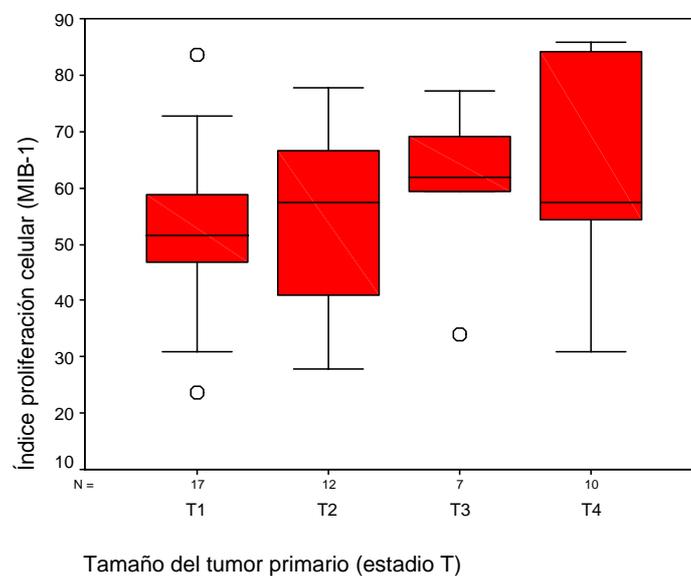


Figura 15: Distribución de MIB-1 según el tamaño del tumor primario (estadio T)

Ganglios linfáticos cervicales (estadio N)

No se encontró una diferencia significativa entre los tumores N0, N1 y N2 ($p=0,579$; ANOVA).

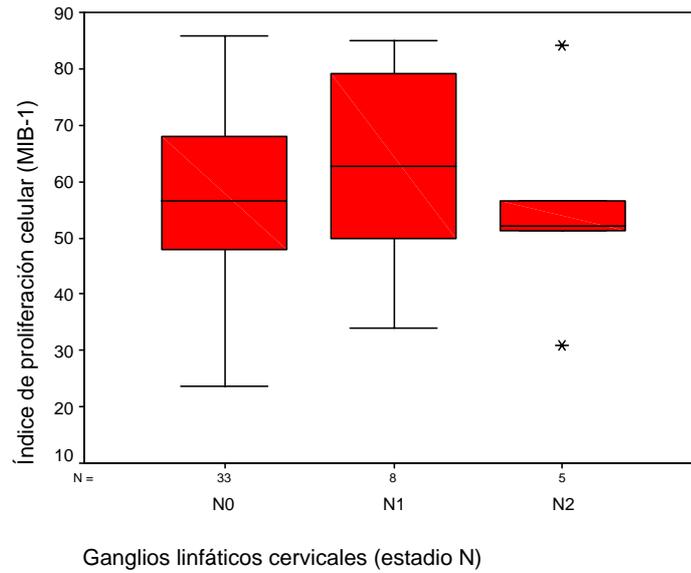


Figura 16: Distribución de MIB-1 según el estadio N

IV.6.A.e. Correlación entre MIB-1 y Estadío Clínico

Al igual que para el tamaño de la lesión, encontramos una tendencia al aumento del índice de proliferación con el avance de la enfermedad a estadios más avanzados. Sin embargo, no observamos una relación significativamente estadística entre el índice de proliferación y el estadio clínico del tumor ($p=0,243$; ANOVA).

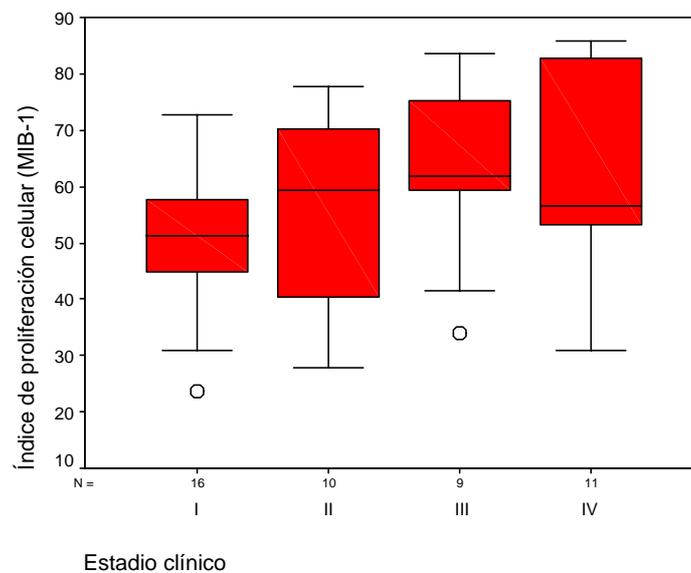


Figura 17: Distribución de MIB-1 según el estadio clínico

IV.6.A.f. Correlación entre MIB-1 y Grado de diferenciación histológica

El índice de proliferación medio de los tumores bien diferenciados ($55,06 \pm 15,83$) fue ligeramente inferior que el de los tumores moderadamente diferenciados ($59,31 \pm 16,99$). Esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0,386$; Test T de Student).

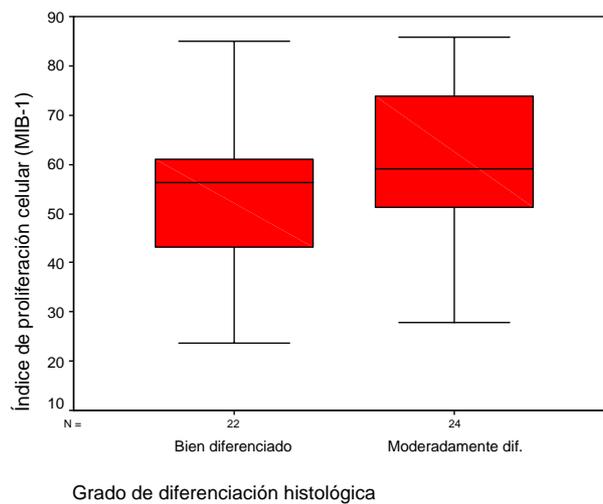


Figura 18: Distribución de MIB-1 según el grado de diferenciación histológica

IV.6.A.g. Correlación entre MIB-1 y Modo de Invasión Tumoral

No se encontró relación estadística entre el índice de proliferación y el modo de invasión tumoral ($p=0,277$; ANOVA)

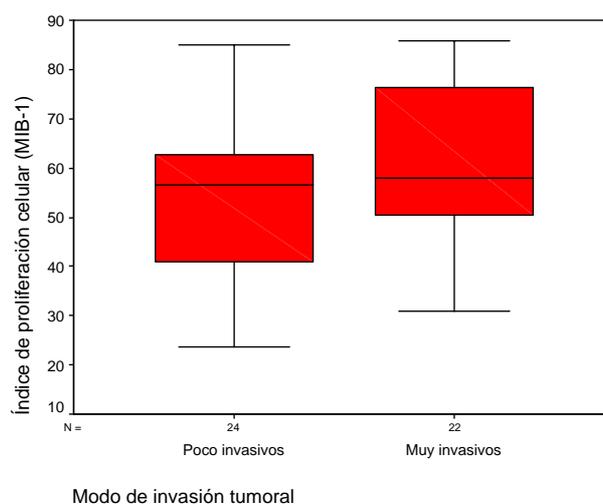


Figura 19: Distribución de MIB-1 según el modo de invasión tumoral

IV.6.A.h. Correlación entre MIB-1 y Profundidad de invasión tumoral

Al relacionar el índice de proliferación celular con la profundidad de invasión del tumor no se obtuvo una correlación estadísticamente significativa ($R= 0,196$, $p=0,253$;).

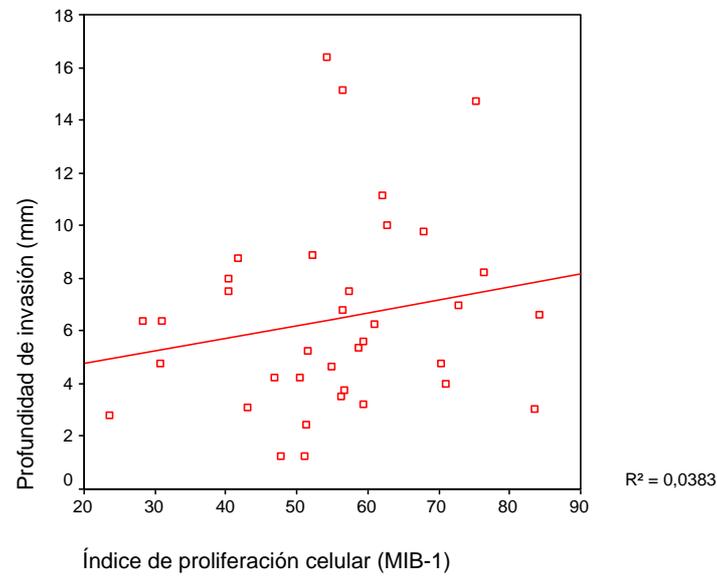


Figura 20: Correlación entre la distribución de MIB-1 y la profundidad de invasión

Variables	N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo
Edad					
- ≤45 años	9	53,42	13,11	34,07	72,72
- >45 años	37	58,21	17,13	23,60	85,92
Sexo					
- Hombres	39	60,15	11,60	23,60	85,92
- Mujeres	7	41,24	15,54	28,24	56,47
Localización					
- Lengua	18	59,79	11,92	40,38	83,50
- Suelo de boca	12	62,50	14,46	34,07	85,92
- Reborde alveolar	9	58,40	22,11	28,24	85,05
- Trígono retromolar	3	43,05	12,90	30,92	56,62
- Paladar duro	3	43,35	13,54	27,71	51,36
- Mucosa yugal	1	23,60	-	23,60	23,60
Tamaño del tumor (estadio T)					
- T1	17	53,35	15,03	23,60	83,50
- T2	12	54,44	17,09	27,71	77,86
- T3	7	61,48	14,14	34,07	77,22
- T4	10	64,42	18,62	30,92	85,92
Ganglios linfáticos cervicales (estadio N)					
- N0	33	56,27	15,82	23,60	85,92
- N1	8	62,82	18,26	34,07	85,05
- N2	5	55,06	19,10	30,92	84,27
Estadio clínico					
- Estadio I	16	51,46	13,29	23,60	72,72
- Estadio II	10	55,95	18,22	27,71	77,86
- Estadio II	9	61,72	16,11	34,07	83,50
- Estadio IV	11	63,30	18,05	30,92	85,92
Diferenciación Histológica					
- Bien diferenciado	22	55,06	15,83	23,60	85,05
- Moderadamente diferenciado	24	59,31	16,99	27,71	85,92
Modo de invasión					
- Poco invasivos	24	54,18	17,05	23,60	85,05
- Muy invasivos	22	60,65	15,34	30,77	85,92
Expresión de EGFR					
- Negativa/ débil	11	57,03	12,81	40,33	77,22
- Moderada/ intensa	35	57,35	17,54	23,60	85,92
Expresión de laminina 5 γ2					
- Negativa/ débil	18	54,71	16,53	23,60	83,50
- Moderada/ intensa	28	58,92	16,40	28,24	85,92
Expresión de cadherina-E					
- Negativa/ débil	14	54,54	13,93	30,77	83,50
- Moderada/ intensa	32	58,45	17,45	23,60	85,92

Tabla 11: Índice de proliferación (MIB-1) del tumor primario en relación con los parámetros clínicos, histológicos e inmunohistoquímicos

IV.6.B. Expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)

La expresión de EGFR se localizó predominantemente en la membrana plasmática, aunque también se pudo observar expresión en el citoplasma celular. Solamente una muestra (2,1%) fue clasificada como expresión negativa. De los 46 casos (97,9%) que presentaron positividad para el EGFR, la intensidad de la expresión fue la siguiente: 1+ en 11 casos (23,4%), 2+ en 19 casos (40,4%) y 3+ en 16 (34%) casos.

EGFR	Expresión negativa/débil		Expresión moderada/ intensa	
	0	1+	2+	3+
n° casos/(%)	1 (2,1%)	11 (23,4%)	19 (40,5%)	16 (34%)
	12 (25,5%)		35 (74,5%)	

Tabla 12: Distribución de la expresión de EGFR

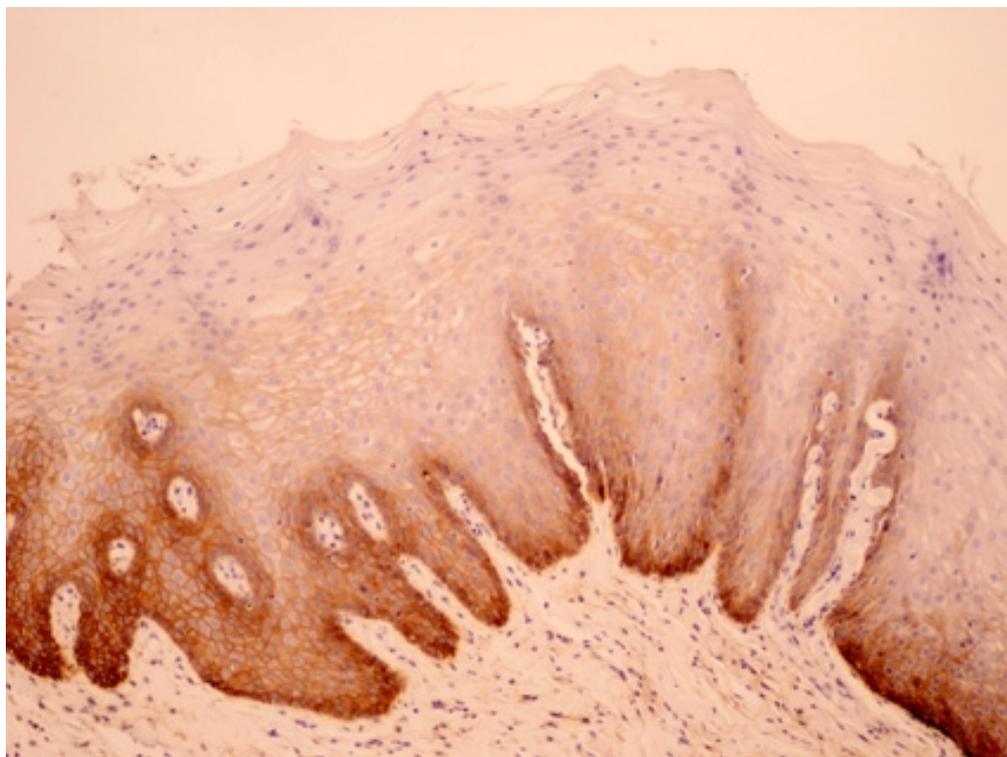


Figura 21: EGFR en la mucosa oral normal. Se observa tinción de membrana intensa en las capas basales y suprabasales del epitelio, disminuyendo hacia la superficie epitelial (10x).

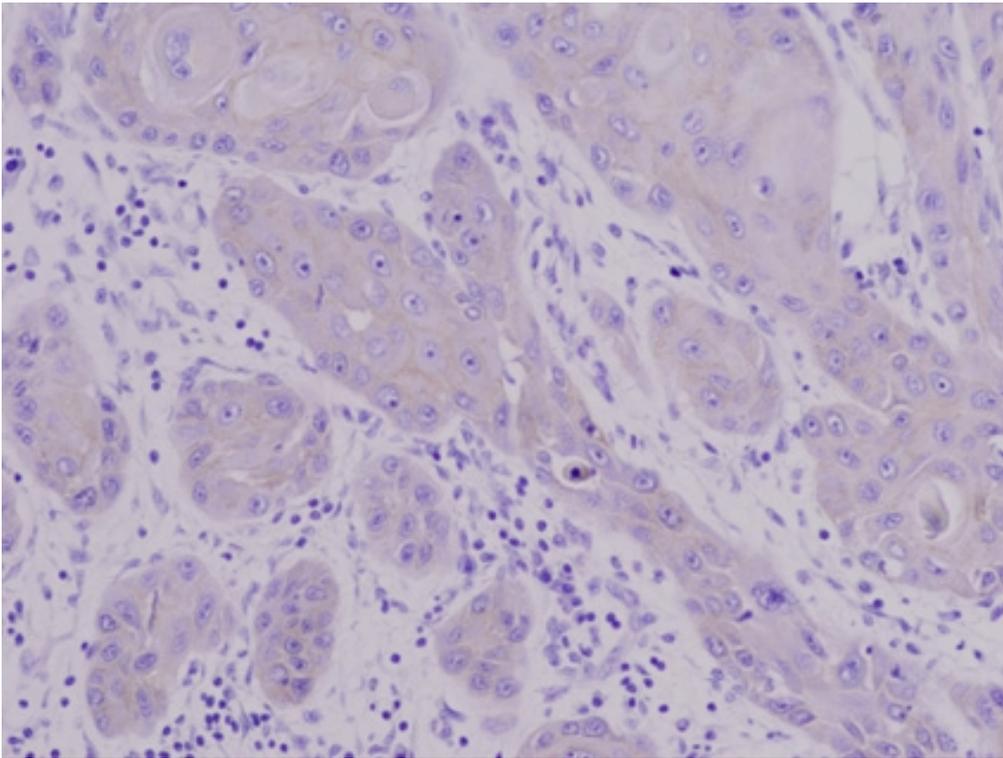


Figura 22: EGFR en el carcinoma oral de células escamosas. Expresión de intensidad débil en la membrana de las células tumorales (20x).

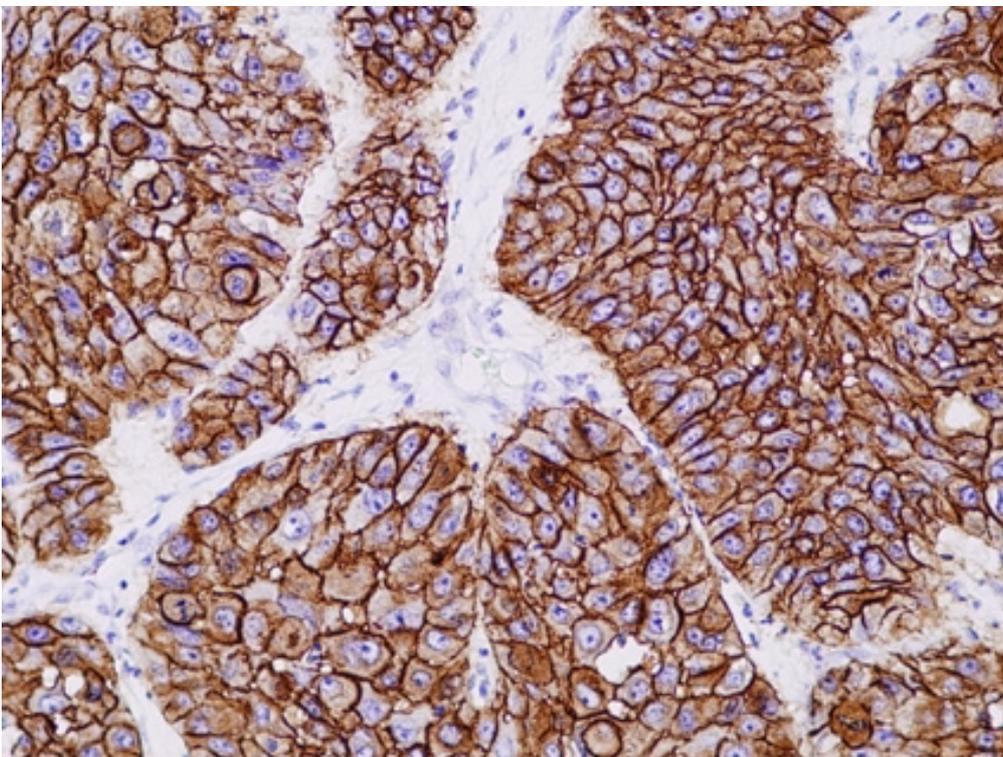


Figura 23: EGFR en el carcinoma oral de células escamosas. Expresión de fuerte intensidad en la membrana de las células tumorales (40x).

IV.6.B.a. Correlación entre la expresión de EGFR y la edad

La media de edad de los pacientes con tumores con expresión negativa/débil de EGFR fue de 61,8 años \pm 11,23, y de 56,44 años \pm 13,67 para los pacientes con tumores con expresión moderada/intensa. Esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p= 0,298$; Test T de student).

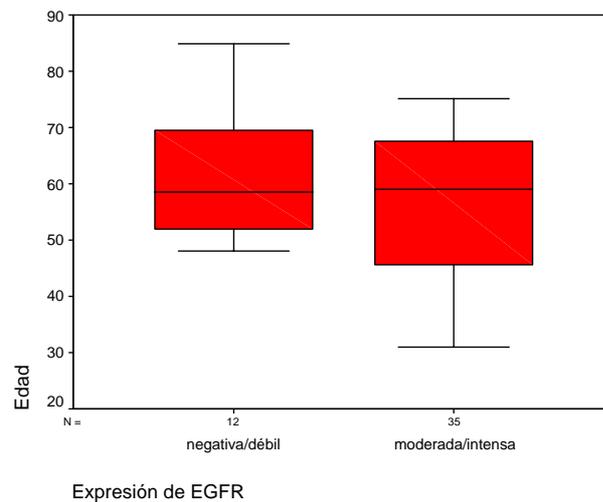


Figura 24: Distribución de la edad de los pacientes según la expresión de EGFR

Al comparar la expresión de EGFR en los tumores de pacientes \leq de 45 años con los pacientes $>$ de 45 años, encontramos que el 100% de los tumores en pacientes \leq de 45 años presentaron expresión moderada/ intensa de EGFR, mientras que este porcentaje se reduce al 68,4% en pacientes $>$ de 45 años. Esta tendencia fue cercana a la significación estadística ($\chi^2= 3,817$; $p= 0,052$; Test de Chi- cuadrado).

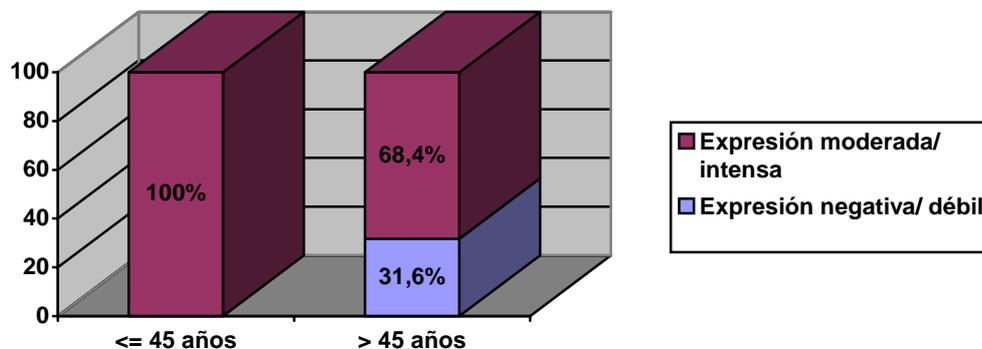


Figura 25: Expresión de EGFR según el rango de edad

IV.6.B.b. Correlación entre la expresión de EGFR y Sexo

No se encontró asociación entre la expresión de EGFR y el sexo de los pacientes ($\chi^2 = 0,001$, $p = 0,970$; Test de Chi-cuadrado).

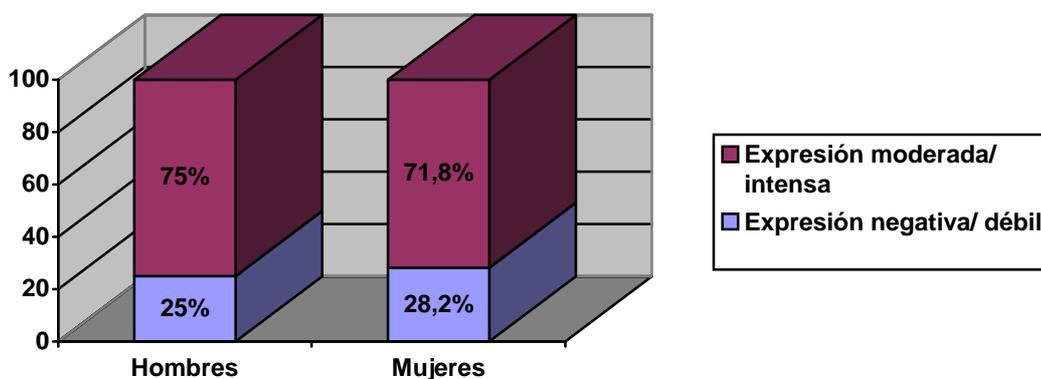


Figura 26: Expresión de EGFR según el sexo

IV.6.B.c. Correlación entre la expresión de EGFR y Localización del tumor primario

Los niveles de expresión de EGFR según las distintas localizaciones de los tumores primarios se pueden observar en gráfico. No encontramos diferencias significativas entre los niveles de expresión de EGFR y la localización del tumor primario ($\chi^2 = 3,643$; $p = 0,602$; Test de Chi-cuadrado).

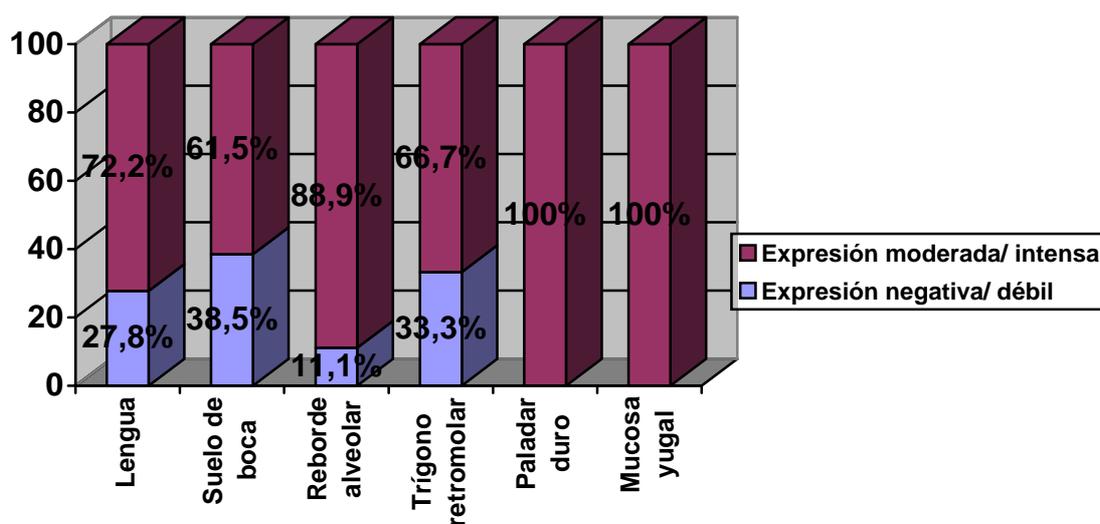


Figura 27: Expresión de EGFR según la localización del tumor primario

IV.6.B.d. Correlación entre la expresión de EGFR y Estadío TNM

Tamaño del tumor primario (estadio T)

Los tumores de mayor tamaño presentaron expresión moderada/intensa de EGFR con más frecuencia que los tumores de menor tamaño. Esta tendencia se acercó a la significación estadística ($\chi^2 = 7,721$; $p = 0,052$; Test de Chi-Cuadrado).

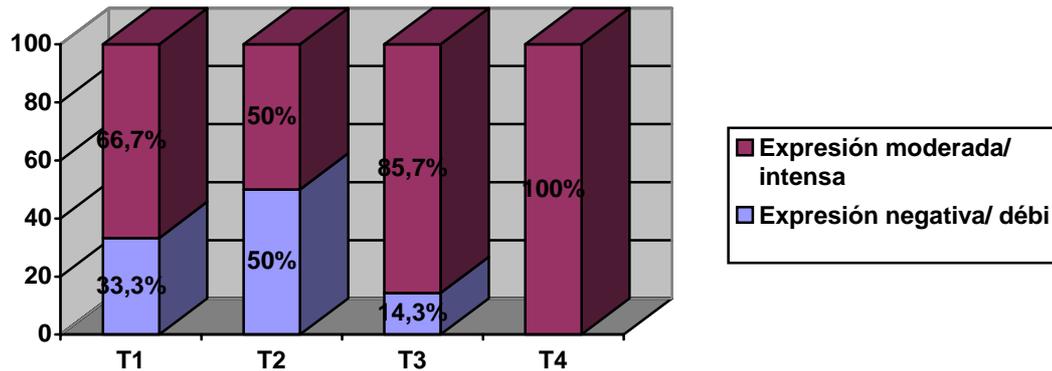


Figura 28: Expresión de EGFR según el tamaño del tumor primario (estadio T)

Ganglios linfáticos Cervicales (estadio N)

No se encontró relación estadísticamente significativa entre la expresión de EGFR y el estadio N ($\chi^2 = 0,097$, $p = 0,952$; Test de Chi-Cuadrado).

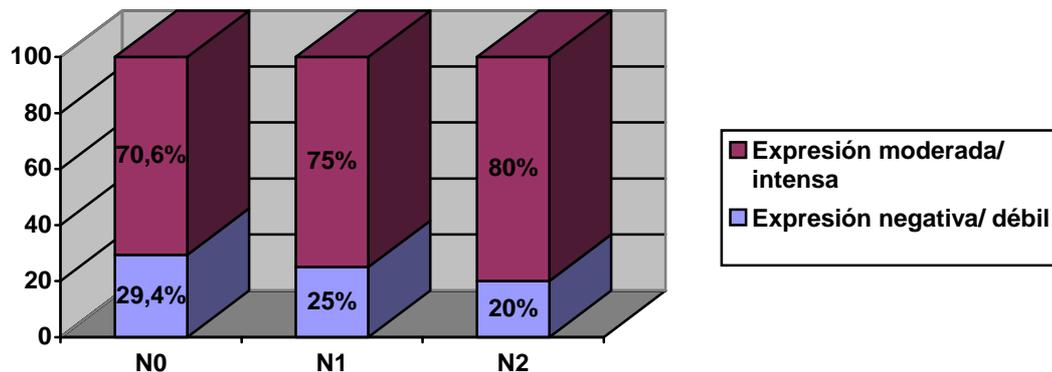


Figura 29: Expresión de EGFR según el estadio N

IV.6.B.e. Correlación entre la expresión de EGFR y Estadio Clínico

El nivel de expresión de EGFR fue más intenso en los estadios más avanzados, probablemente debido a la influencia del tamaño del tumor en esta clasificación, sin embargo no se encontró una relación estadísticamente significativa entre la expresión de EGFR y el estadio clínico del tumor ($\chi^2=2,851$; $p=0,415$; Test de Chi- Cuadrado).

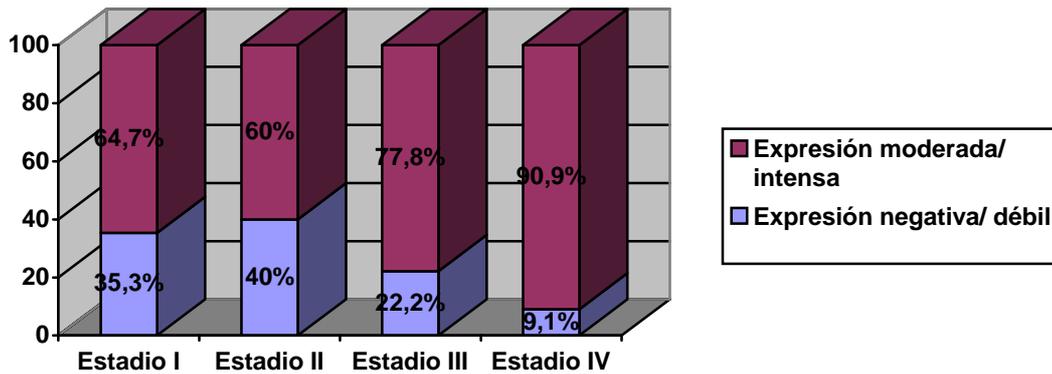


Figura 30: Expresión de EGFR según el estadio clínico

IV.6.B.f. Correlación entre la expresión de EGFR y Grado de diferenciación histológica

Los tumores moderadamente diferenciados presentaron expresión moderada/intensa de EGFR con más frecuencia que los tumores bien diferenciados, sin embargo esta relación no fue estadísticamente significativa ($\chi^2=0,860$; $p=0,354$; Test de Chi-cuadrado).

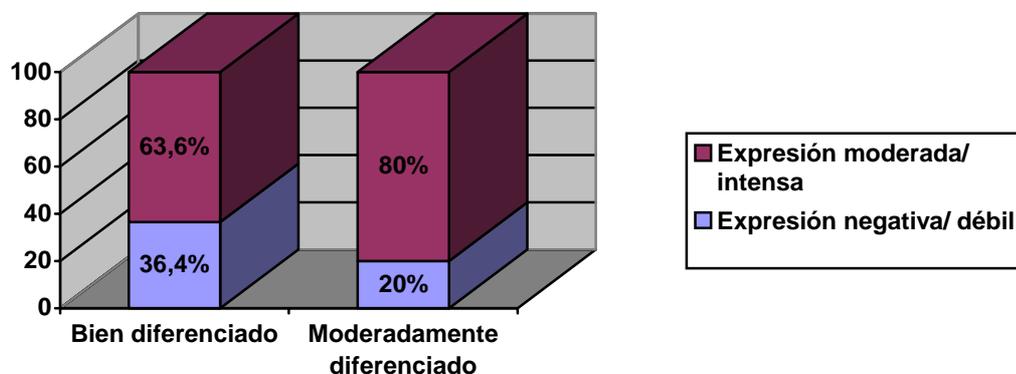


Figura 31: Expresión de EGFR según el grado de diferenciación histológica

IV.6.B.g. Correlación entre la expresión de EGFR y Modo de invasión tumoral

No se encontró relación estadística entre la expresión de EGFR y el modo de invasión tumoral ($\chi^2=0,66$; $p=0,767$; Test de Chi- cuadrado).

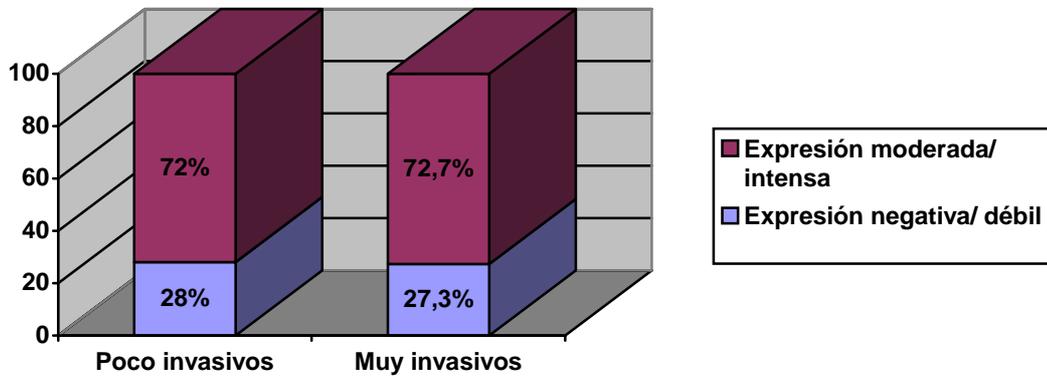


Figura 32: Niveles de expresión de EGFR según el modo de invasión tumoral

IV.6.B.h. Correlación entre la expresión de EGFR y Profundidad de invasión

La profundidad media de los tumores con expresión negativa/débil de EGFR fue de $6,14 \pm 3,67$ mm, y de $6,52 \pm 3,77$ mm para los tumores con expresión moderada/intensa. Esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0,840$; Test T de Student).

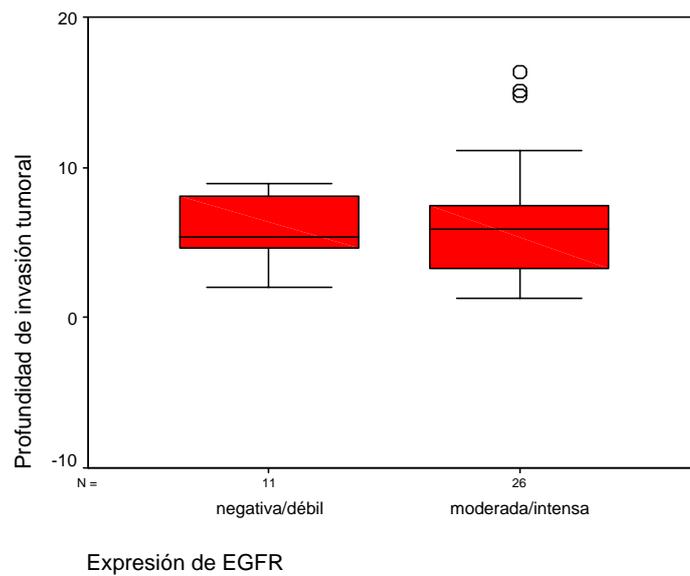


Figura 33: Profundidad de invasión tumoral según la expresión de EGFR

IV.6.C. Expresión de laminina 5 γ 2

La expresión de la Laminina 5 γ 2 se detectó claramente en el citoplasma de las células tumorales, pero no en el epitelio normal adyacente, con excepción de algunas áreas con displasia epitelial donde se pudo detectar inmunopositividad en la capa basal. Solamente 4 muestras fueron completamente negativas. Se observaron variaciones en los patrones de expresión en diferentes áreas del mismo tumor. Sin embargo, los patrones de tinción fueron característicos y se pudieron clasificar cada uno de los tumores de acuerdo con el patrón de expresión predominante.

Como se explicó en el apartado de material y métodos, la expresión de laminina 5 γ 2 se valoró mediante dos escalas.

Según el patrón de expresión, 13 (27,7%) de los tumores presentaron un patrón de expresión A, 9 (19,1%) patrón de expresión B, 16 (34%) patrón de expresión C y 9 (19,1%) patrón D. Según el porcentaje de células positivas, 19 (40,4%) tumores presentaron <30% de las células tumorales positivas, 16 (34%) entre 30-60% de las células tumorales positivas y 12 (25,6%) >60% de las células tumorales positivas.

El número de células tumorales positivas aumentó significativamente con la progresión del patrón de expresión desde el patrón A hacia el patrón D ($\chi^2 = 53,42$, $p=0,000$; Test de Chi-cuadrado).

	Expresión ausente/ débil		Expresión moderada/ intensa		Total
	A	B	C	D	
0	4	0			13
1+	9	6			9
2+		3	11	2	16
3+			5	7	9
Total	13	9	16	9	47
	22		25		

Tabla 13: Distribución de la expresión de Laminina 5 γ 2 según las dos escalas de valoración

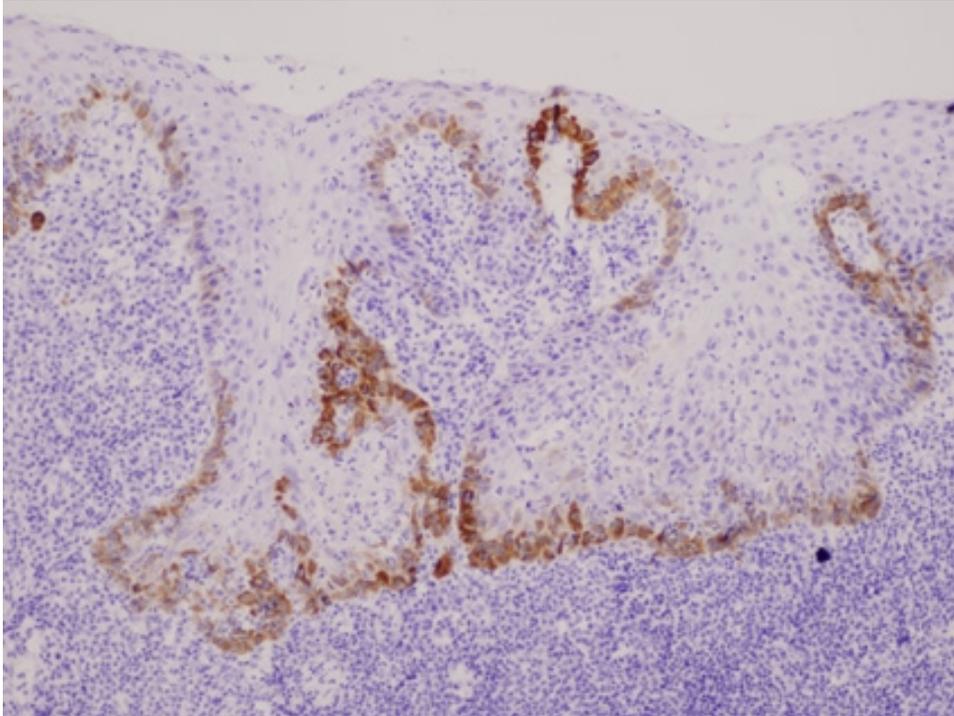


Figura 34. Laminina 5 γ 2 en el epitelio displásico adyacente al carcinoma oral de células escamosas. Se observa inmunotinción citoplasmática en la capa basal del epitelio (10x).

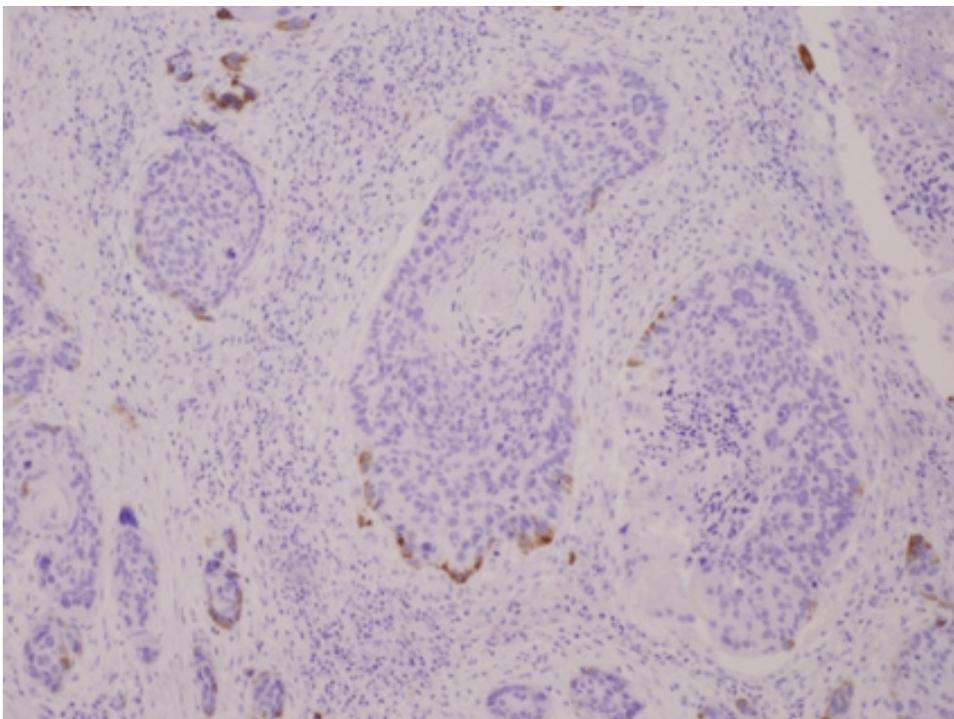


Figura 35: Laminina 5 γ 2 en carcinoma oral de células escamosas. Se advierte ocasionales células positivas en la periferia de los nidos tumorales (10x).

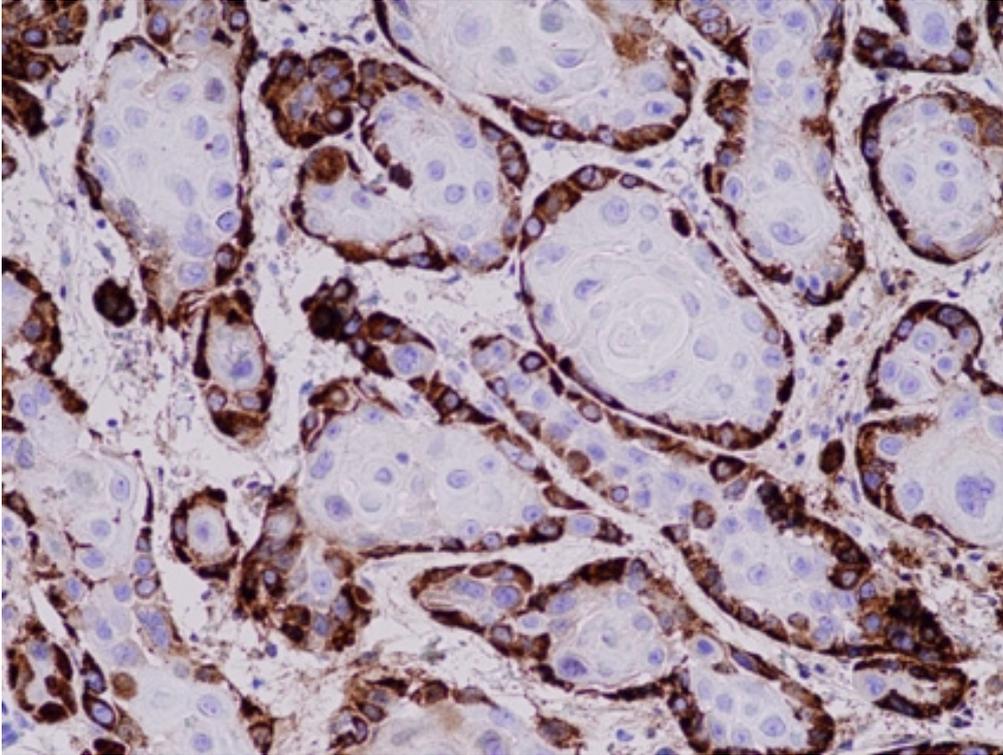


Figura 36: Laminina 5 γ 2 en carcinoma oral de células escamosas. La inmunotinción aparece restringida a la periferia de los nidos tumorales (20x).

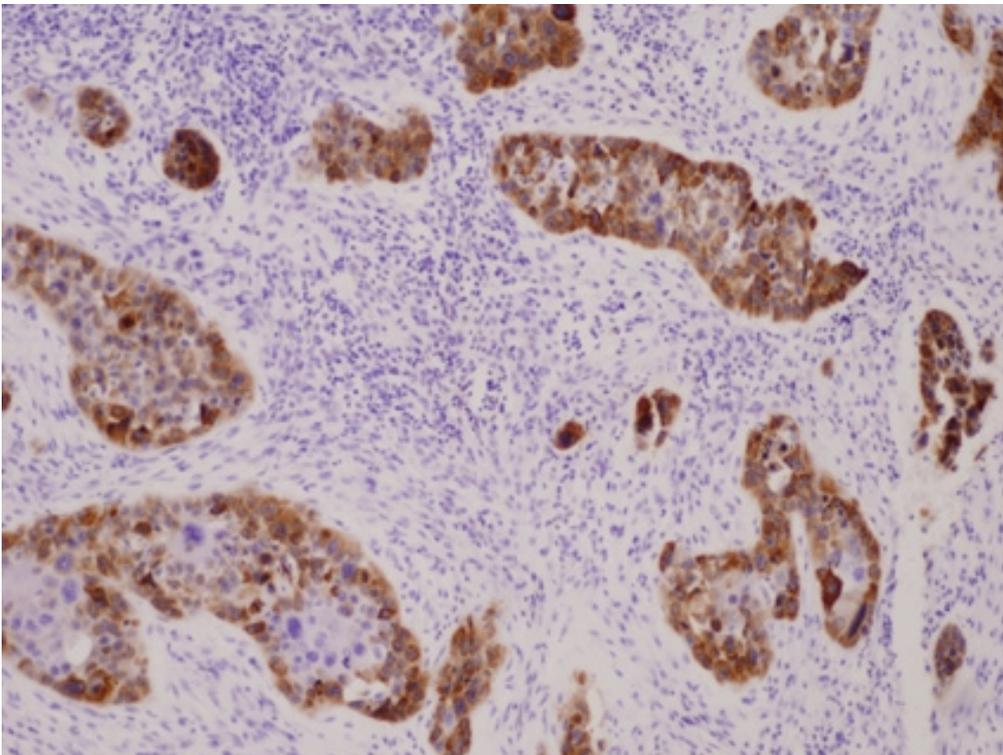


Figura 37: Laminina 5 γ 2 en carcinoma oral de células escamosas. Se observa inmunorreactividad tanto en la periferia como en el centro de los nidos tumorales (10x).

IV.6.C.a Correlación entre la expresión de laminina 5 γ 2 y Edad

La media de edad de los pacientes con tumores con expresión negativa/débil de laminina 5 γ 2 fue de 57,36 años \pm 12,36, y de 57,96 \pm 13,98 para los pacientes con tumores con expresión moderada/intensa. Esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0,877$; T de Student).

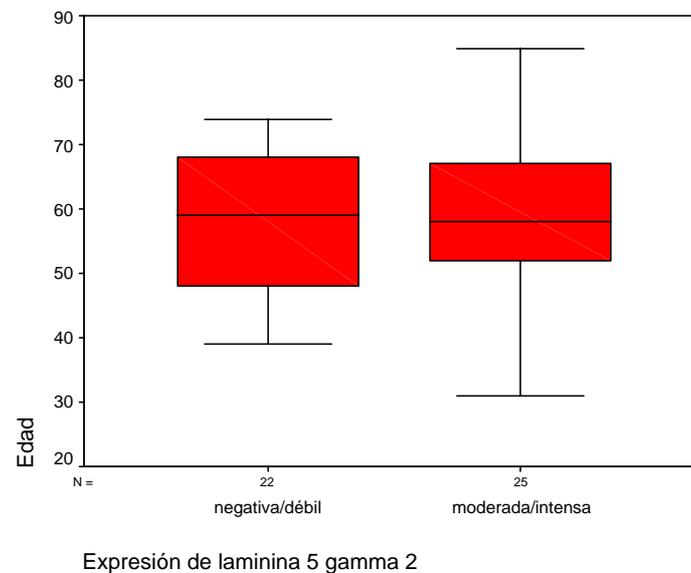


Figura 38: Distribución de la edad de los pacientes según la expresión de laminina 5 γ 2

Al comparar la expresión de laminina 5 γ 2 en los tumores de pacientes ≤ 45 años con los pacientes >45 años, tampoco se encontró una relación significativa entre la expresión de laminina 5 γ 2 y la edad ($p=0,874$; Test exacto de Fisher).

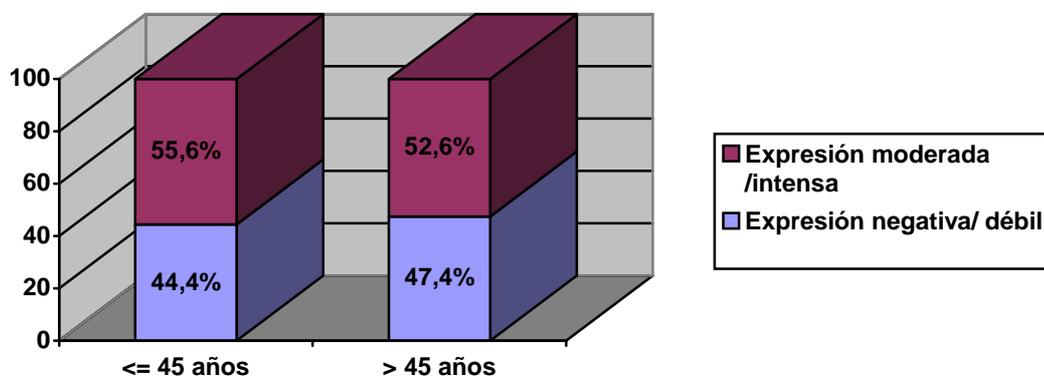


Figura 39: Expresión de laminina 5 γ 2 según el rango de edad

IV.6.C.b. Correlación entre la expresión de laminina 5γ2 y Sexo

No se encontró una relación estadísticamente significativa entre la expresión de Laminina 5γ2 y el sexo de los pacientes. (p= 0,706; Test de Chi-cuadrado)

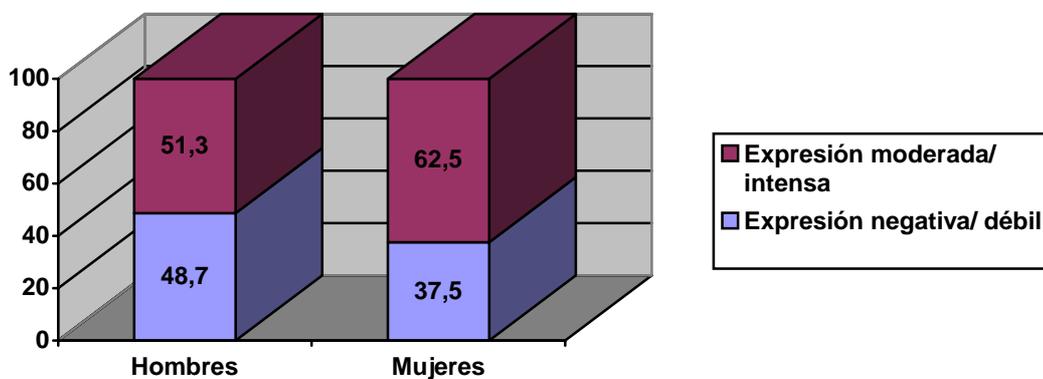


Figura 40: Expresión de laminina 5γ2 según el sexo

IV.6.C.c. Correlación entre la expresión de laminina 5γ2 y Localización

No se encontró asociación entre la expresión de laminina 5γ2 y la localización del tumor primario ($\chi^2 = 4,571$, p=0,470; Test de Chi-cuadrado)

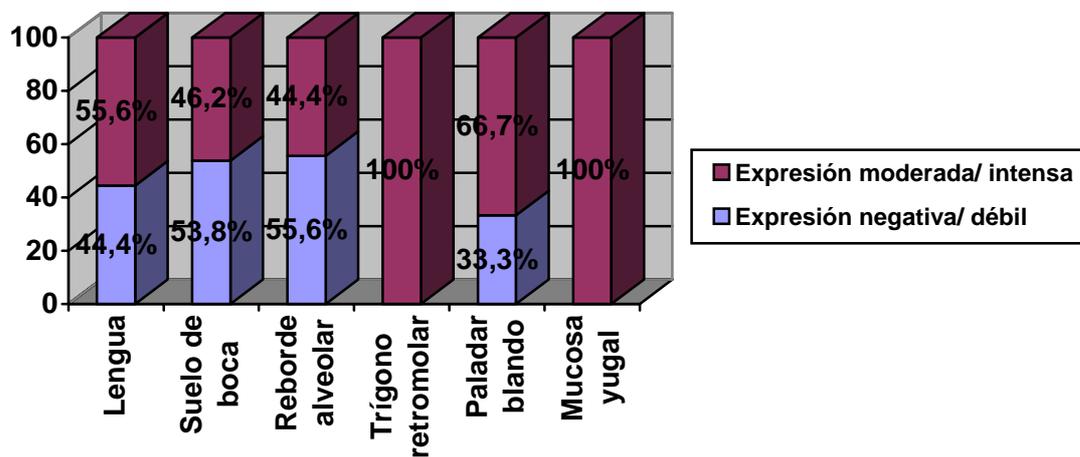


Figura 41: Expresión de laminina 5γ2 según la localización del tumor primario

IV.6.C.d. Correlación entre la expresión de laminina 5 γ 2 y Estadío TNM

Tamaño del tumor primario (estadío T)

No se encontró una correlación estadísticamente significativa entre la expresión de laminina 5 γ 2 y el tamaño del tumor primario ($\chi^2 = 1,915$, $p = 0,590$; Test de Chi-cuadrado).

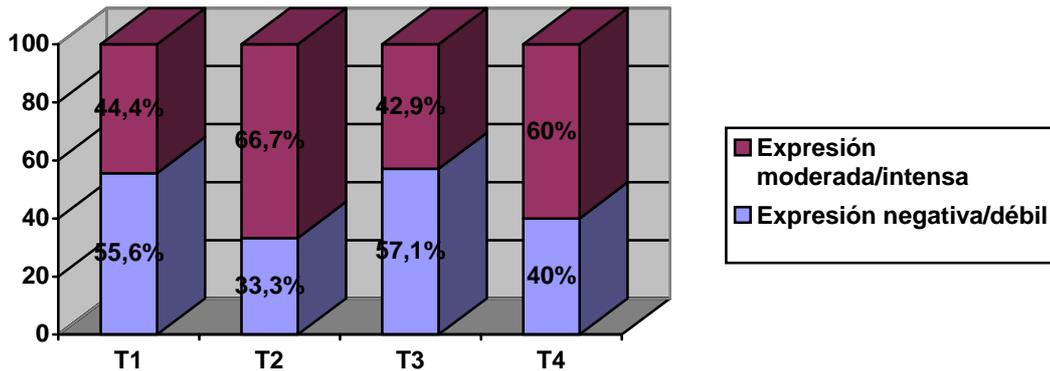


Figura 42: Expresión de laminina 5 γ 2 según el tamaño del tumor (estadío T)

Ganglios linfáticos cervicales (estadío N)

No se encontró una relación estadísticamente significativa entre la expresión de laminina 5 γ 2 y la afectación de los ganglios linfáticos cervicales ($\chi^2 = 0,983$, $p = 0,612$; Test de Chi-cuadrado).

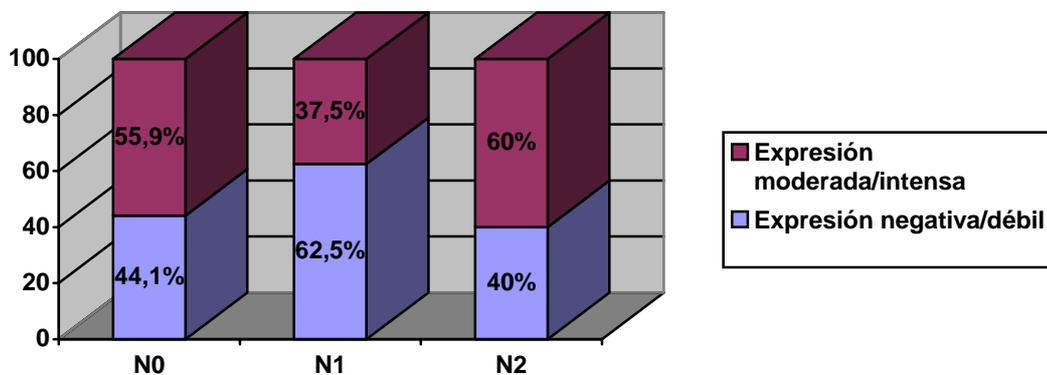


Figura 43: Expresión de laminina 5 γ 2 según el estadío N

IV.6.C.e. Correlación entre la expresión de Laminina 5 γ 2 y Estadío Clínico

No se encontró una relación estadísticamente significativa entre la expresión de laminina 5 γ 2 y el estadío clínico del tumor ($\chi^2=1,676$, $p=0,642$; Test de Chi-cuadrado).

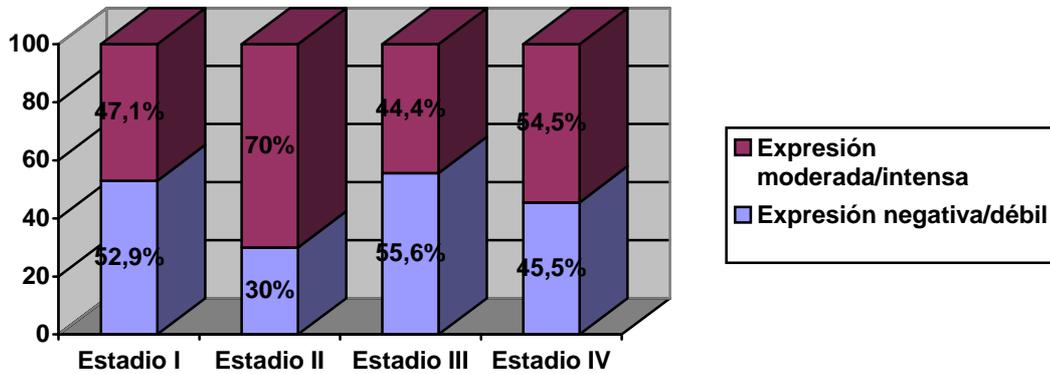


Figura 44: Expresión de laminina 5 γ 2 según el estadío clínico

IV.6.C.f. Correlación entre la expresión de Laminina 5 γ 2 y Grado de diferenciación histológica

No se encontró una relación estadísticamente significativa entre la expresión de laminina 5 γ 2 y el grado de diferenciación histológica del tumor ($\chi^2 =0,169$, $p=0,681$; Test de Chi-cuadrado).

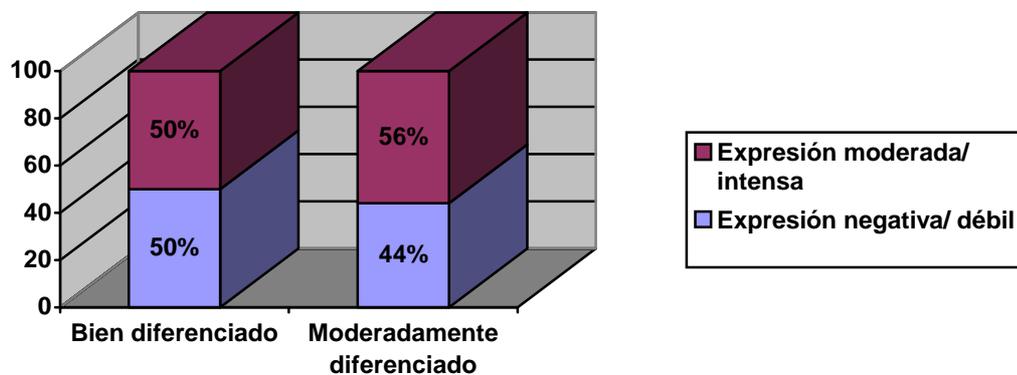


Figura 45: Expresión de laminina 5 γ 2 según el grado de diferenciación histológica

IV.6.C.g. Correlación entre la expresión de Laminina 5 γ 2 y Modo de Invasión Tumoral

No se encontró relación entre la expresión de laminina 5 γ 2 y el modo de invasión tumoral ($\chi^2=0,030$, $p=0,861$; Test de Chi-cuadrado).

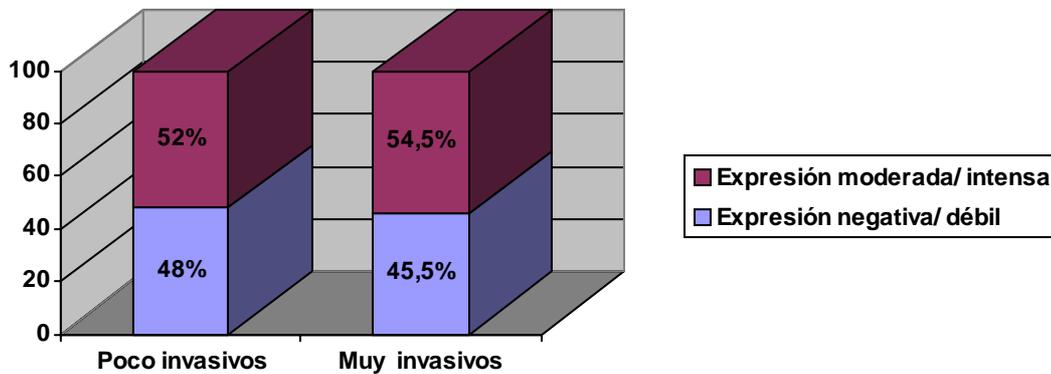


Figura 46: Expresión de laminina 5 γ 2 según el modo de invasión tumoral

IV.6.C.h. Correlación entre la expresión de Laminina 5 γ 2 y Profundidad de invasión del tumor

La profundidad media de los tumores con expresión negativa/débil de laminina 5 γ 2 fue de $6,12 \pm 3,67$ mm, y de $6,52 \pm 3,77$ mm para los tumores con expresión moderada/intensa. Esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0,745$; Test T de Student).

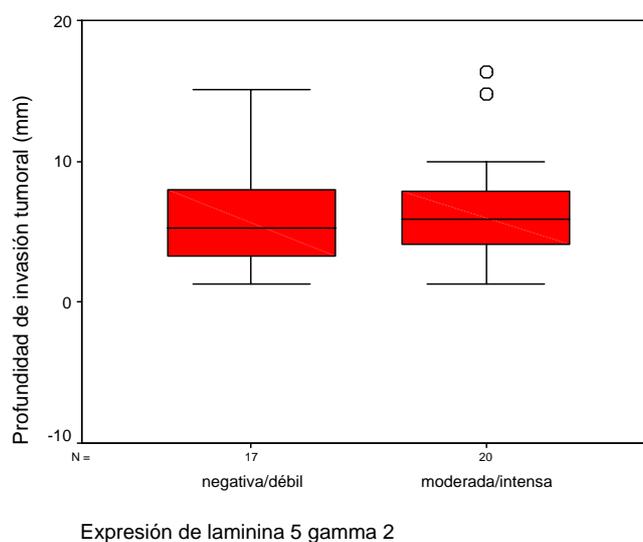


Figura 47: Profundidad de invasión según la expresión de la expresión de laminina 5 γ 2

IV.6.D. Expresión de cadherina-E

La expresión de cadherina-E fue clasificada como negativa en 1 caso (2,1%), débil en 13 casos (27,7%), moderada en 25 casos (53,2%), intensa en 8 casos (17%). Por lo tanto la expresión fue negativa/débil en 14 casos (29,8%) y moderada/intensa en 33 casos (70,2%).

Expresión negativa/débil		Expresión moderada/ intensa	
0	1+	2+	3+
1 (2,1%)	13 (27,7%)	25 (53,2%)	8 (17%)
14 (29,8%)		33 (70,2%)	

Tabla 14: Distribución de la expresión de cadherina-E en los tumores

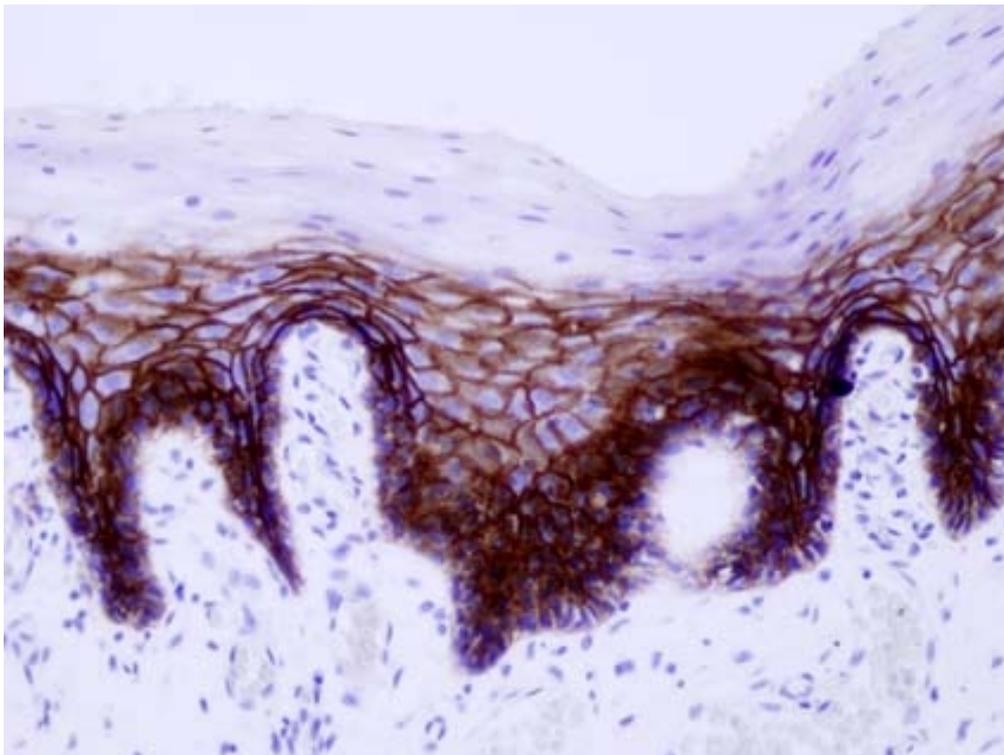


Figura 48: Cadherina-E en la mucosa oral normal. Se observa expresión de fuerte intensidad en los dos tercios basales del epitelio (20x).

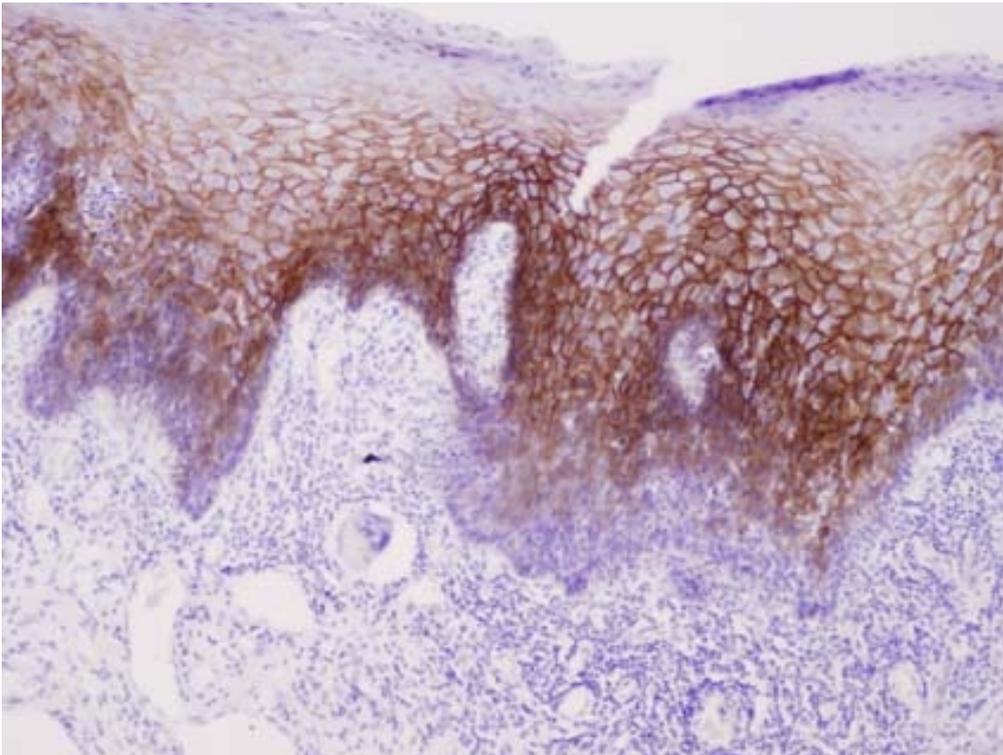


Figura 49: Cadherina-E en mucosa oral con displasia adyacente a una lesión de carcinoma oral de células escamosas. Se observa la pérdida de expresión en la capa basal y suprabasal (10x).

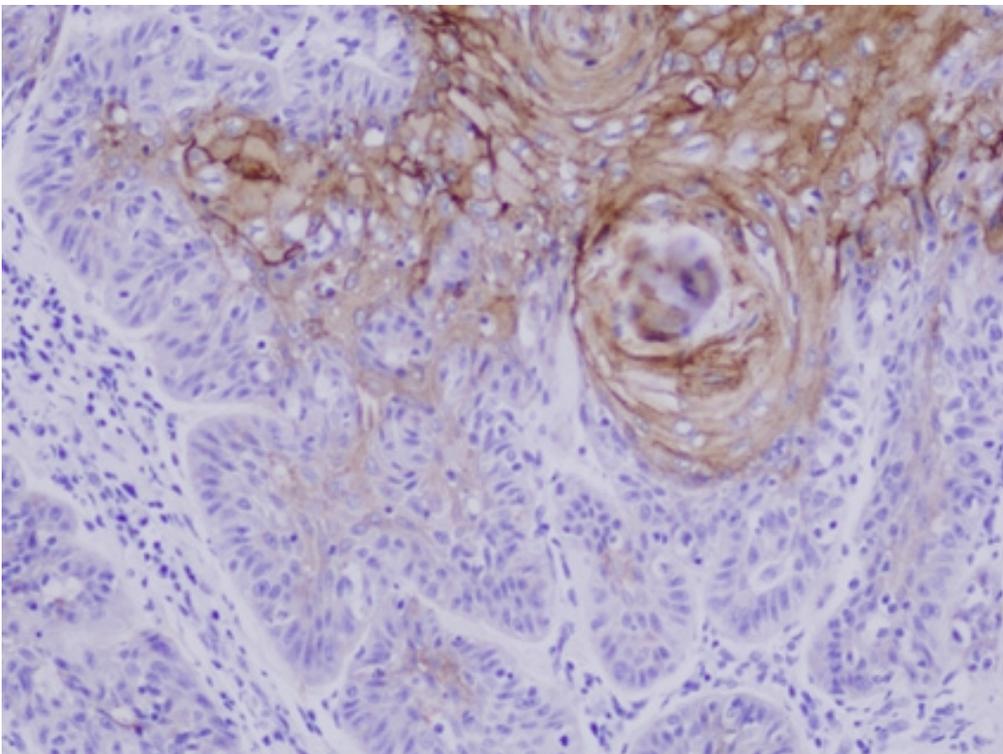


Figura 50: Cadherina-E en carcinoma oral de células escamosas. Se observa la pérdida de expresión en el frente de invasión tumoral (20x).

IV.6.D.a. Correlación entre la expresión de cadherina-E y Edad

La media de edad de los pacientes con tumores con expresión moderada/ intensa de cadherina-E fue de $57,61 \pm 13,61$, y de $57,86 \pm 11,84$ para los pacientes con tumores con expresión negativa/débil. Esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0,952$; Test T de Student).

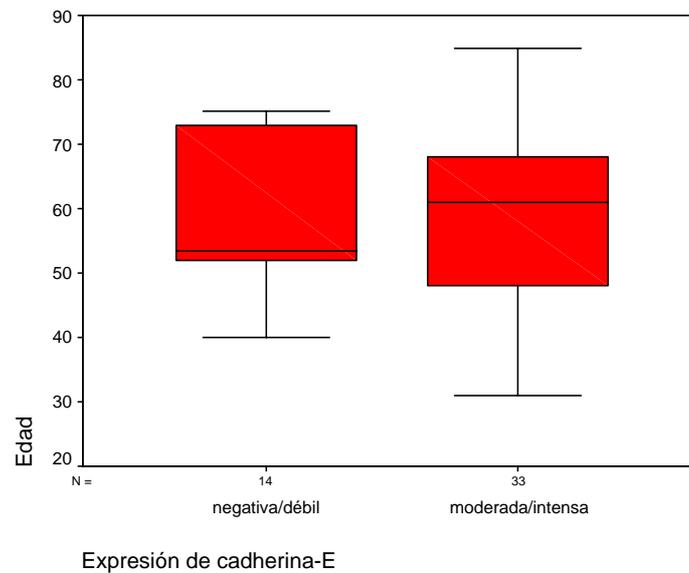


Figura 51: Expresión de cadherina-E según la edad

Al comparar la expresión de cadherina-E entre los tumores de pacientes ≤ 45 y > 45 años, tampoco obtuvimos una asociación estadísticamente significativa entre la edad y la expresión de cadherina-E ($\chi^2 = 0,305$; $p=0,581$; Test de Chi-cuadrado).

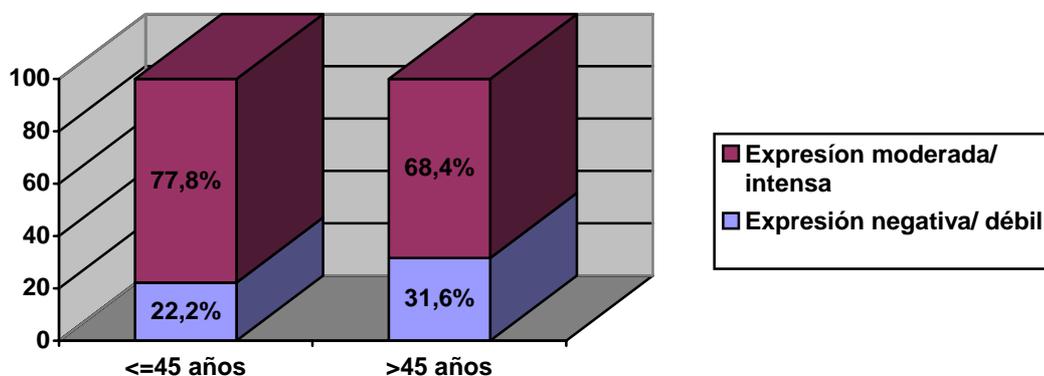


Figura 52: Expresión de cadherina-E según el rango de edad

IV.6.D.b. Correlación entre la expresión de cadherina-E y Sexo

No se encontró una asociación entre la expresión de cadherina-E y el sexo de los pacientes ($\chi^2=0,106$, $p=0,745$; Test de Chi-cuadrado).

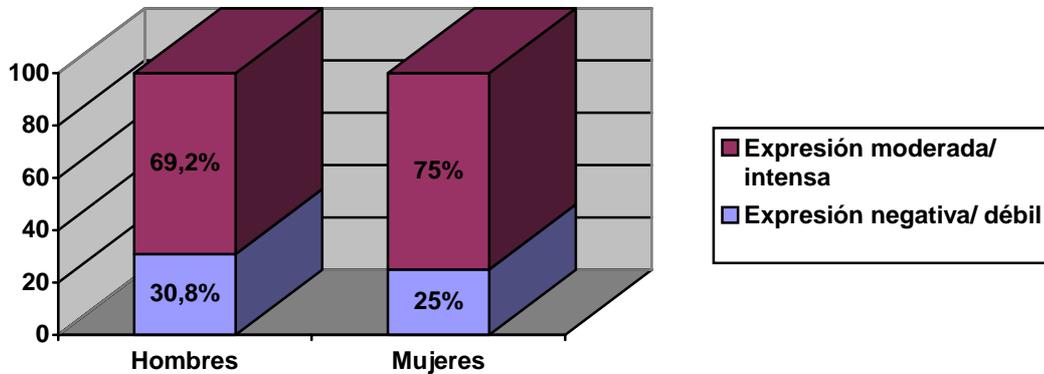


Figura 53: Expresión de cadherina-E según el sexo

IV.6.D.c. Correlación entre la expresión de cadherina-E y Localización del tumor primario

La expresión de cadherina-E no se asoció con la localización primaria del tumor ($\chi^2=0,821$; $p=0,976$; Test de Chi-cuadrado).

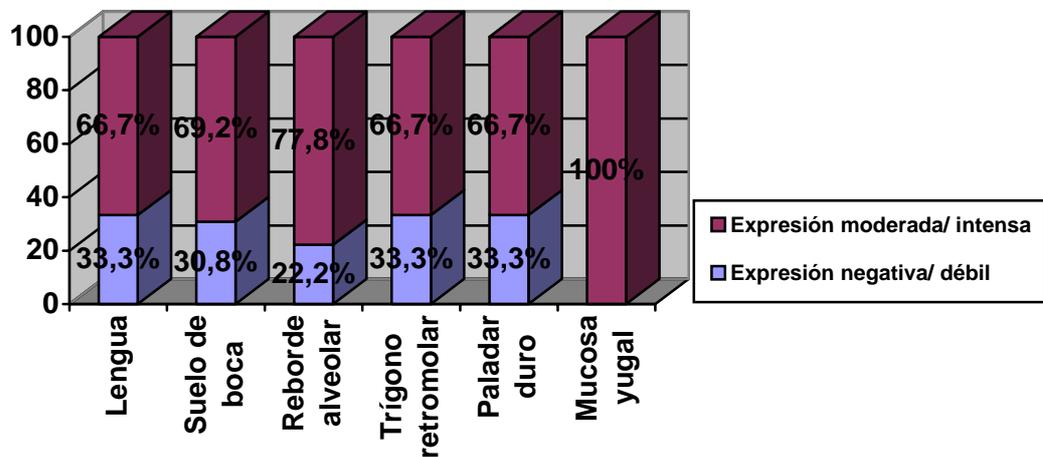


Figura 54: Expresión de cadherina-E según la localización del tumor primario

IV.6.D.d. Correlación entre la expresión de cadherina-E y Estadio TNM

Tamaño del tumor primario(estadio T)

No se encontró asociación entre la expresión de cadherina-E y el tamaño del tumor primario ($\chi^2 = 0,643$, $p=0,886$, Test de Chi-cuadrado).

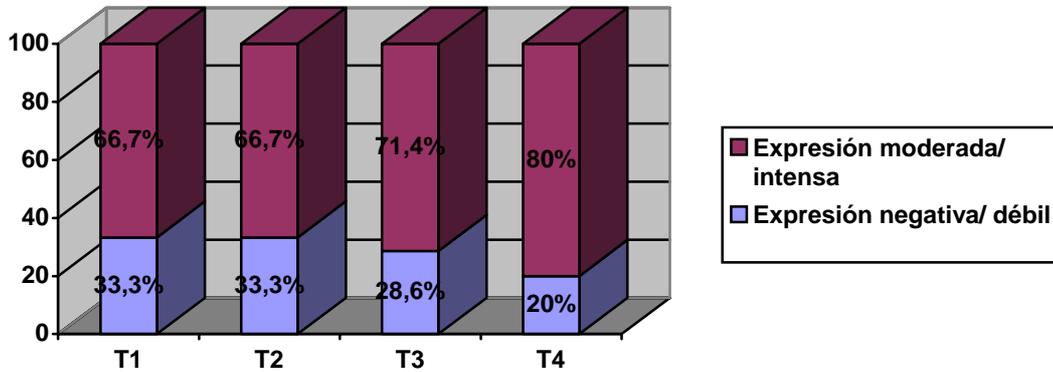


Figura 55: Expresión de cadherina-E según el tamaño del tumor primario

Ganglios linfáticos cervicales (estadio N)

No se encontró asociación entre la expresión de cadherina-E y el estadio N del tumor ($\chi^2 = 0,339$, $p=0,844$; Test de Chi-cuadrado).

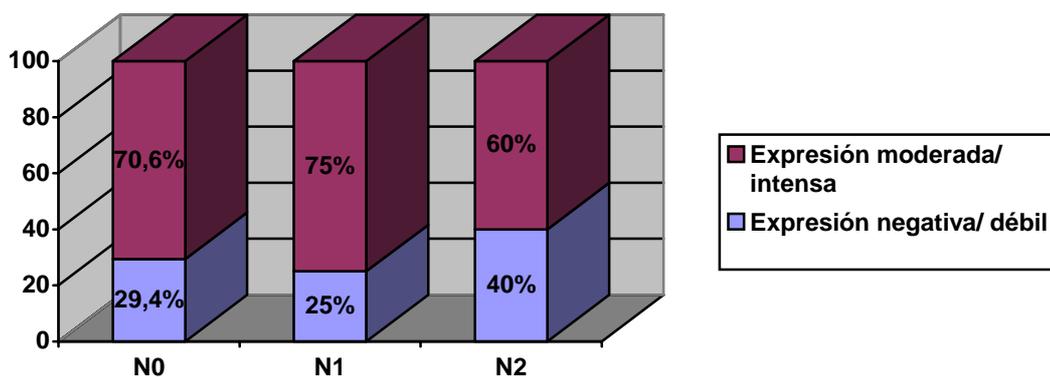


Figura 56: Expresión de cadherina-E según el estadio N

IV.6.D.e. Correlación entre la expresión de cadherina-E y Estadio Clínico

No se encontró asociación entre la expresión de cadherina-E y el estadio clínico del tumor ($\chi^2=1,417$, $p=0,702$; Test de Chi-cuadrado).

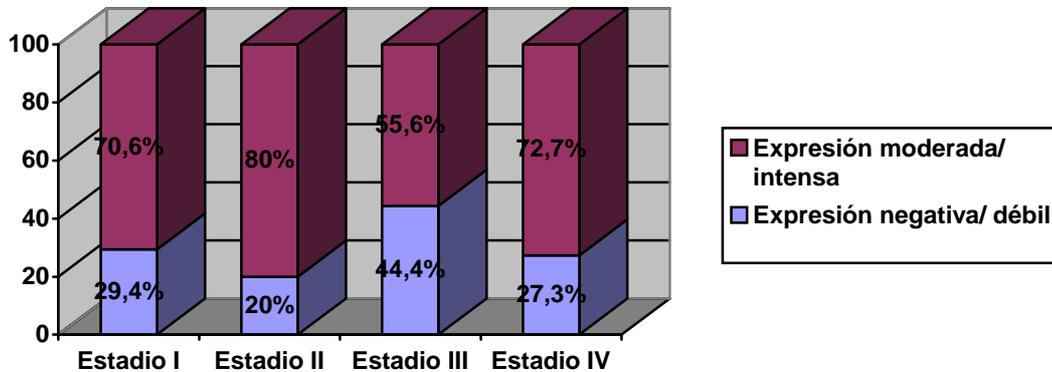


Figura 57: Expresión de cadherina-E según el estadio clínico

IV.6.D.f. Correlación entre la expresión de cadherina-E y Grado de diferenciación histológica

Los tumores moderadamente diferenciados presentaron una expresión débil/ausente de cadherina-E con mayor frecuencia que los tumores bien diferenciados, sin embargo, esta relación no fue estadísticamente significativa ($\chi^2=2,664$, $p=0,103$; Test de Chi-cuadrado).

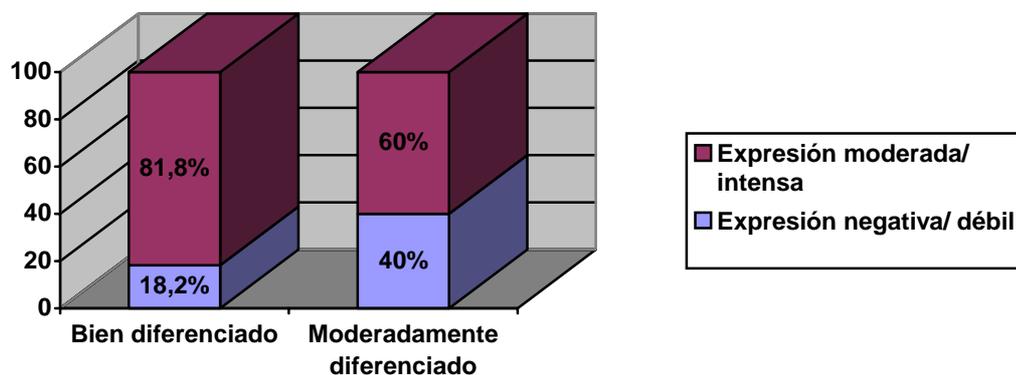


Figura 58: Expresión de cadherina-E según el grado de diferenciación histológica

IV.6.D.g. Correlación entre la expresión de cadherina-E y Modo de invasión tumoral

Los tumores muy invasivos presentaron expresión negativa/débil de cadherina-E con más frecuencia que lo tumores pocos invasivos: 45,5% y 16%, respectivamente. Esta asociación fue estadísticamente significativa ($\chi^2 = 4,854$ p= 0,028; Test de Chi-cuadrado).

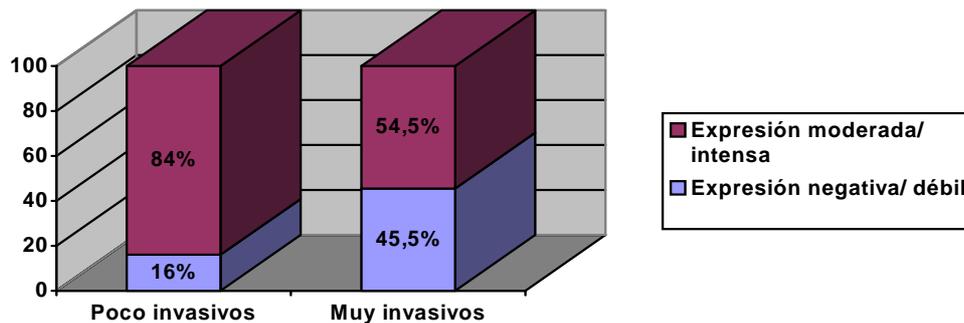


Figura 59: Expresión de cadherina-E según el modo de invasión tumoral

IV.6.D.h. Correlación entre la expresión de cadherina-E y Profundidad de invasión tumoral

La profundidad media de los tumores con expresión negativa/débil de cadherina-E fue de $6,25 \pm 3,53$ mm y de los tumores con expresión moderada/intensa fue de $6,51 \pm 4,12$ mm. Esta diferencia no fue estadísticamente significativa. (p=0,842; Test T de Student)

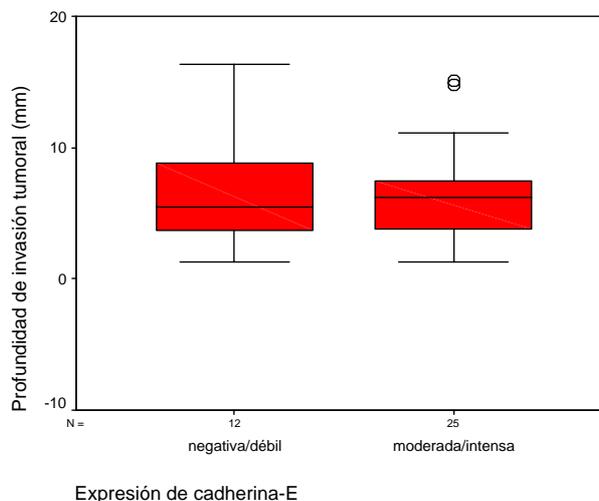


Figura 60: Profundidad de invasión según la expresión de cadherina-E

IV. 6.E. Correlación entre marcadores inmunohistoquímicos

IV.6.E.a. Correlación entre índice de proliferación celular (MIB-1) y EGFR

La media de proliferación celular en los tumores con expresión negativa/ débil de EGFR fue de $57,03 \pm 12,81$, mientras en los tumores con expresión moderada/intensa el índice medio de proliferación fue de $57,35 \pm 17,54$. Esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p= 0,956$; Test T de Student).

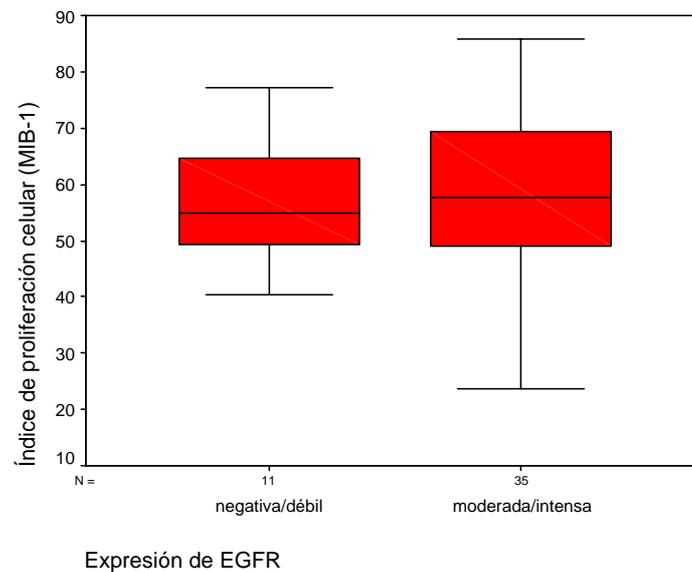


Figura 61: Distribución de MIB-1 según la expresión de EGFR

IV.6.E.b. Correlación entre índice de proliferación celular (MIB-1) y Laminina 5 γ 2

La media del índice de proliferación en las lesiones con expresión negativa/débil de laminina 5 γ 2 fue de $56,18 \pm 17,21$ y de $58,19 \pm 15,99$ en las lesiones con expresión moderada/intensa. Esta diferencia no fue estadísticamente significativa. ($p=0,683$; Test T de Student)

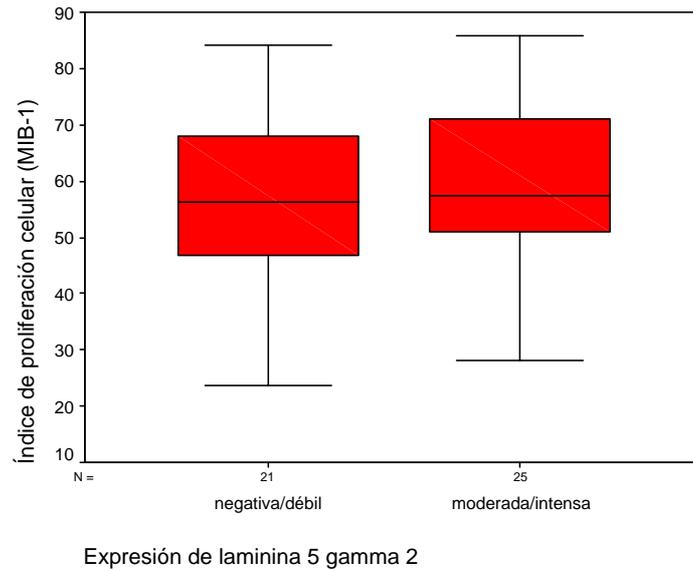


Figura 62: Distribución de MIB-1 según la expresión de laminina 5 y2

IV.6.E.c. Correlación entre Índice de proliferación celular (MIB-1) y Cadherina-E

El índice medio de proliferación de los tumores con moderada/intensa cadherina-E fue de $58,45\% \pm 17,45$, y de los tumores con expresión negativa/débil fue de $54,58\% \pm 13,93$. Esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0,467$; Test T de Student).

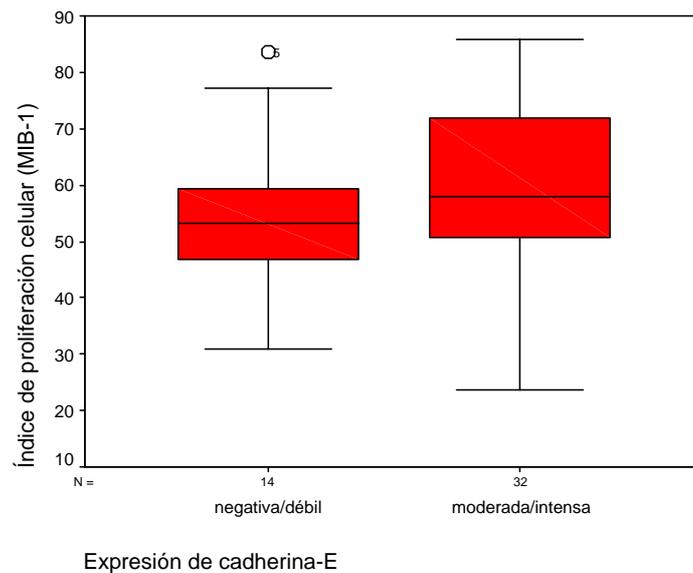


Figura 63: Distribución de MIB-1 según la expresión de cadherina-E

IV.6.E.d. Correlación entre EGFR y Laminina 5 γ 2

No se encontró relación entre la expresión de EGFR y laminina 5 γ 2 ($\chi^2=0,66$; $p=0,797$; Test de Chi-cuadrado).

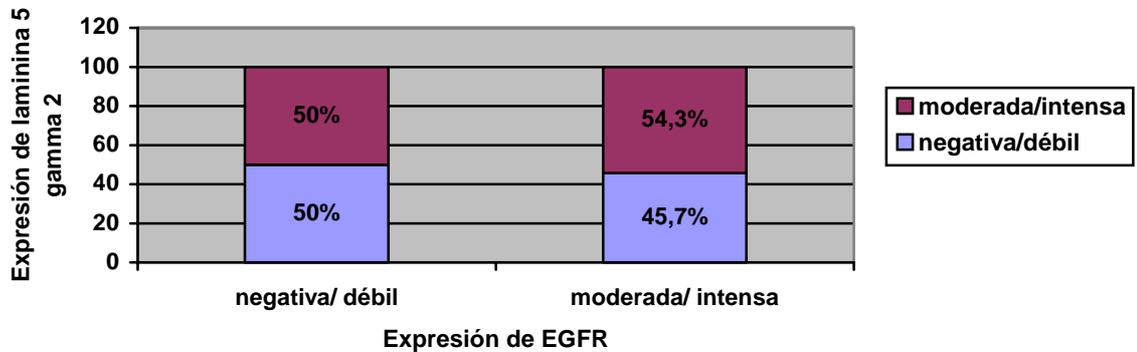


Figura 64: Expresión de laminina 5 γ 2 según la expresión de EGFR

IV.6.E.e. Correlación entre EGFR y Cadherina-E

No se encontró relación entre la expresión de EGFR y cadherina-E ($\chi^2=1,087$; $p=0,297$; Test de Chi-cuadrado).

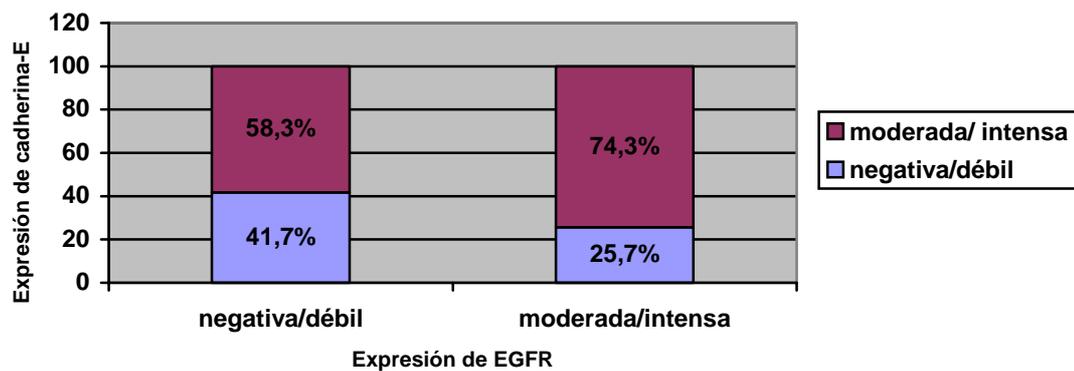


Figura 65: Expresión de cadherina-E según la expresión de EGFR

IV.6.E.f. Correlación entre Laminina 5 γ 2 y Cadherina-E

No se encontró una relación entre la expresión de laminina 5 γ 2 y cadherina-E ($\chi^2=0,986$; $p=0,321$; Test de Chi-cuadrado).

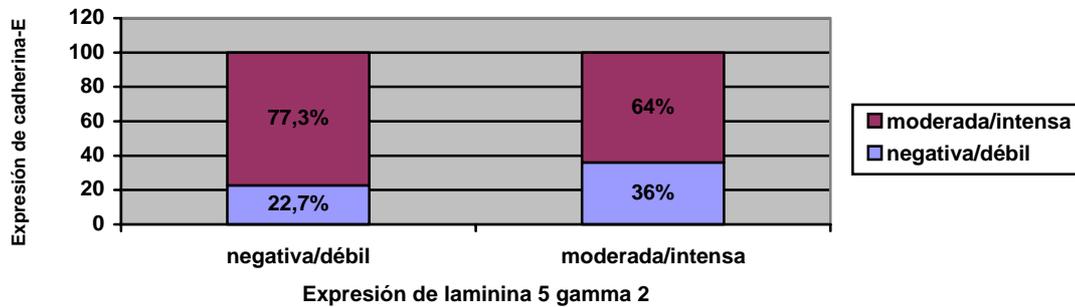


Figura 66: Expresión de cadherina-E según la Expresión de laminina 5 γ 2

IV.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS RECIDIVAS LOCALES

IV.7.A. Parámetros clínicos

IV.7.A.a. Edad

No se encontró una diferencia significativa entre la media de edad de los pacientes con recidiva local ($53,50 \pm 13,72$ años) y los pacientes que no presentaron recidiva local ($59,84 \pm 13,72$ años) ($p=0,114$; Test T de Student).

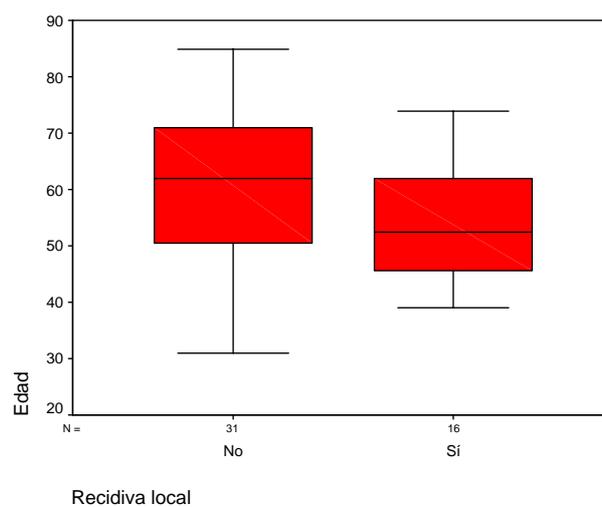


Figura 67: Distribución de la edad de los pacientes en función de la aparición de recidivas locales

Al analizar las recidivas en los pacientes ≤ 45 y >45 años, tampoco se encontró asociación entre la edad y la aparición de recidiva local ($\chi^2=0,536$, $p=0,464$; Test de Chi-cuadrado).

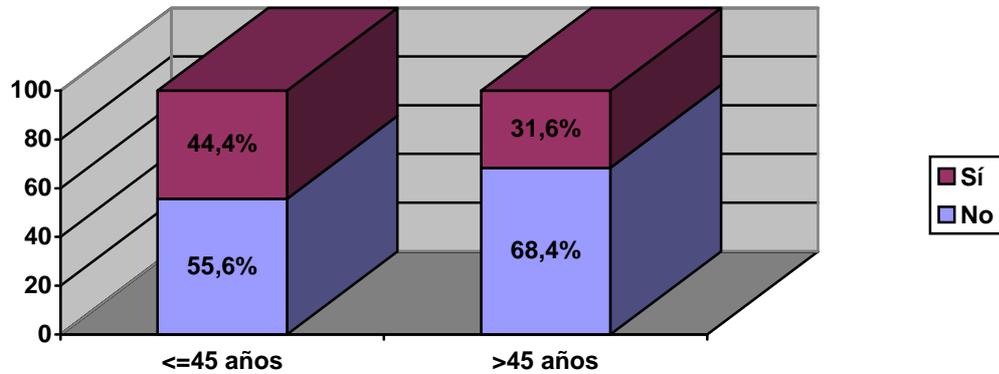


Figura 68: Aparición de recidivas locales en función del rango de edad de los pacientes

IV.7.A.b. Sexo

No se encontró asociación entre el sexo del paciente y la aparición de recidiva local ($\chi^2=0,351$; $p=0,553$; Test de Chi-cuadrado).

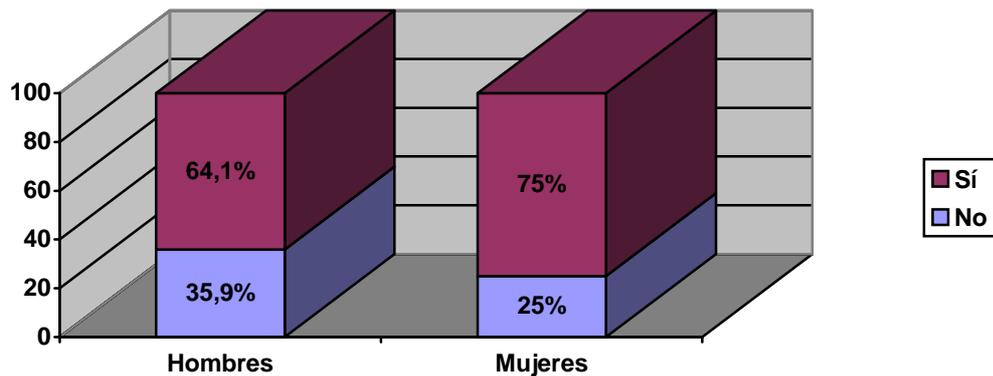


Figura 69: Aparición de recidivas locales en función del sexo de los pacientes

IV.7.A.c. Localización

No se encontró asociación significativa entre la localización del tumor primario y la aparición de recidivas locales. ($\chi^2=1,683$, $p=0,891$; Test de Chi-Cuadrado)

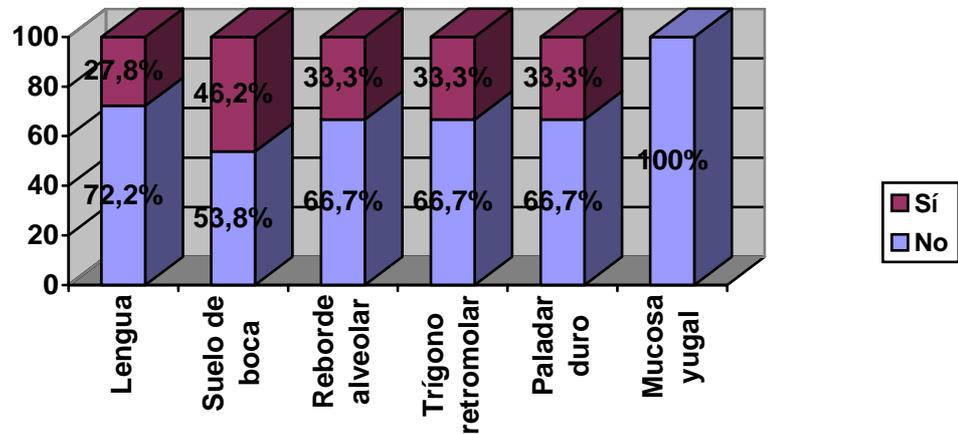


Figura 70: Aparición de recidivas locales en función de la localización del tumor primario

IV.7.A.d. Estadio TNM

Tamaño del tumor primario (estadio T)

No se encontró correlación entre el tamaño del tumor primario y la recidiva local ($\chi^2=5,009$, $p=0,171$; Test de Chi-cuadrado).

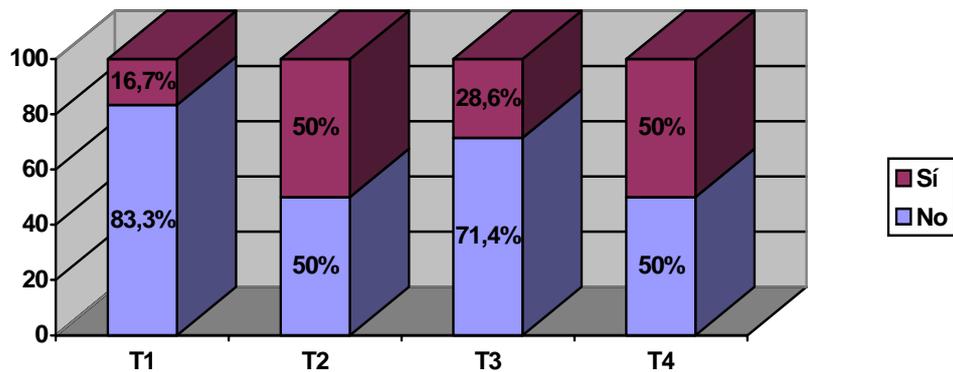


Figura 71: Aparición de recidivas locales en función del tamaño del tumor primario

Ganglios linfáticos cervicales (estadio N)

Los pacientes con adenopatías cervicales palpables presentaron recidiva con más frecuencia en comparación con los pacientes con cuellos clínicamente negativos, sin embargo, no existió correlación entre el estadio N y las recidivas locales ($\chi^2=3,276$, $p=0,194$; Test de Chi-cuadrado).

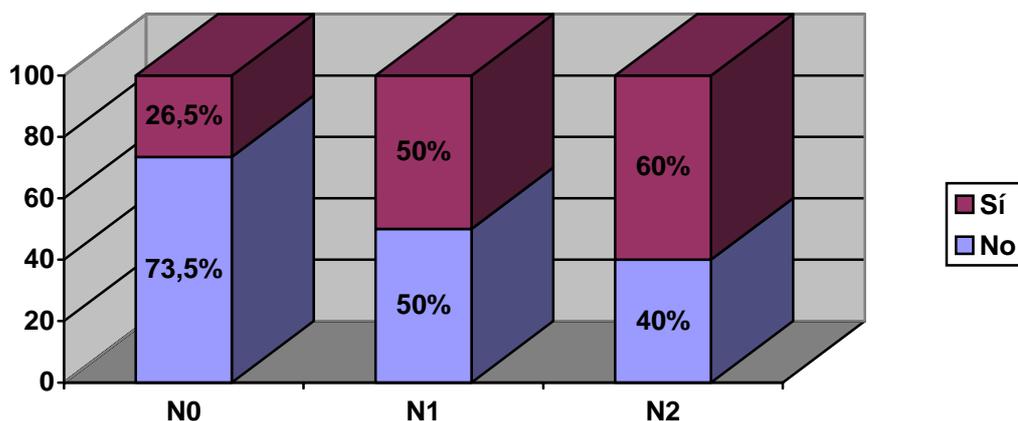


Figura 72: Aparición de recidivas locales en función del estadio N

IV.7.A.e. Estadio clínico

No se encontró asociación entre el estadio clínico y la aparición de recidivas locales ($\chi^2=5,789$; $p=0,122$; Test de Chi-cuadrado).

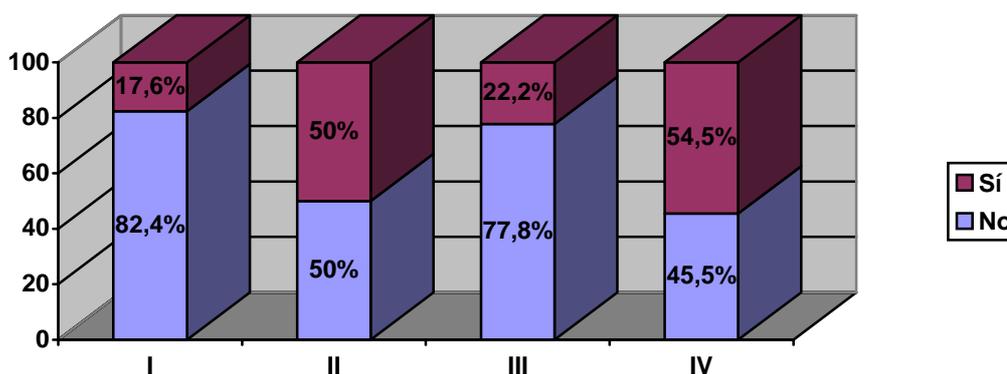


Figura 73: Aparición de recidivas locales en función del estadio clínico

IV.7.A.f. Tratamiento del tumor primario

La aparición de recidivas locales fue más frecuente en los pacientes que recibieron terapia combinada de cirugía + radioterapia; sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($\chi^2=0,827$; $p=0,176$; Test de Chi-cuadrado).

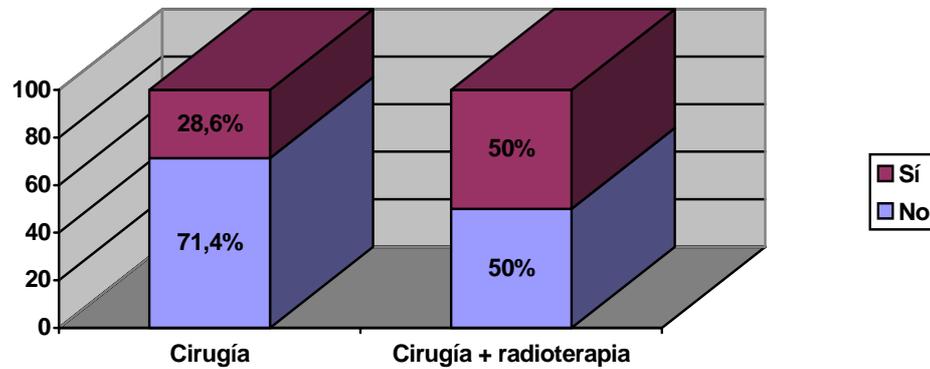


Figura 74: Aparición de recidivas locales en función del tratamiento del tumor primario

IV.7.B. Parámetros Histológicos

IV.7.B.a. Grado de diferenciación histológica

Se encontró una correlación entre el grado de diferenciación histológica y las recidivas locales. Los tumores moderadamente diferenciados presentaron recidiva local con más frecuencia que los tumores bien diferenciados ($\chi^2= 4,634$, $p=0,031$; Test de Chi-cuadrado).

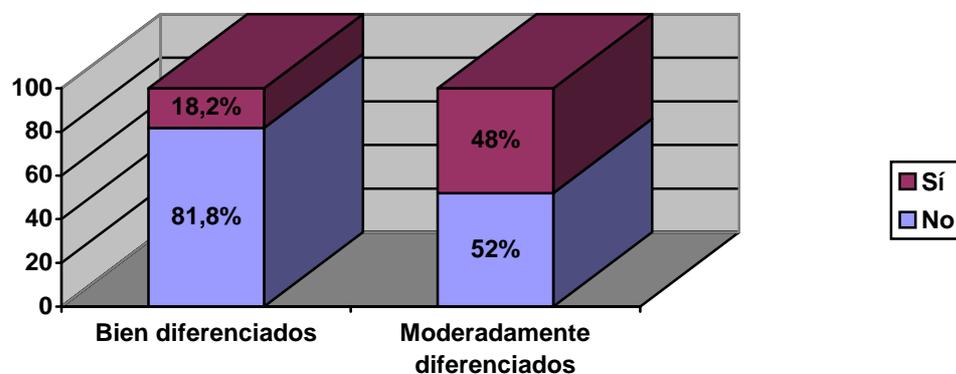


Figura 75: Aparición de recidivas locales en función del grado de diferenciación histológica

IV.7.B.b. Modo de Invasión Tumoral

Se encontró una correlación entre el modo de invasión del tumor y las recidivas locales. Los tumores clasificados como muy invasivos recurrieron con más frecuencia en comparación con los tumores poco invasivos ($\chi^2 = 7,74$, $p = 0,005$; Test de Chi-cuadrado).

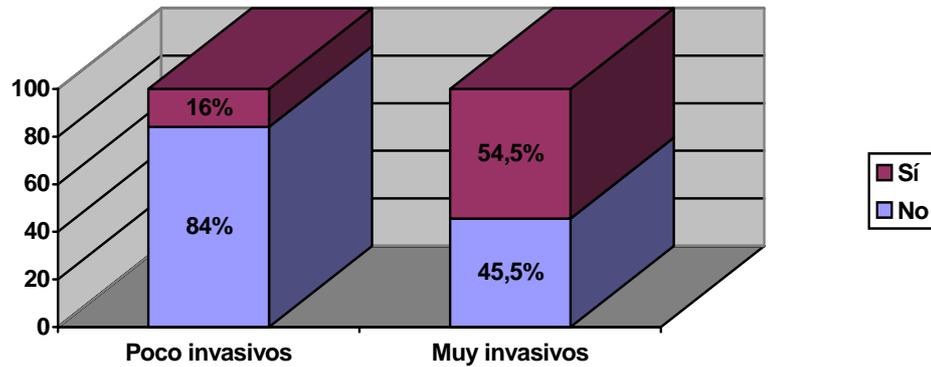


Figura 76: Aparición de recidivas locales en función del modo de invasión tumoral

IV.7.B.c. Profundidad de Invasión Tumoral

La profundidad media de los tumores que presentaron recidiva local (n=9) fue de $7,41 \pm 4,45$ mm y de los tumores que no presentaron recidiva local fue de $5,99 \pm 3,41$ mm. Esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0,321$; Test T de Student).

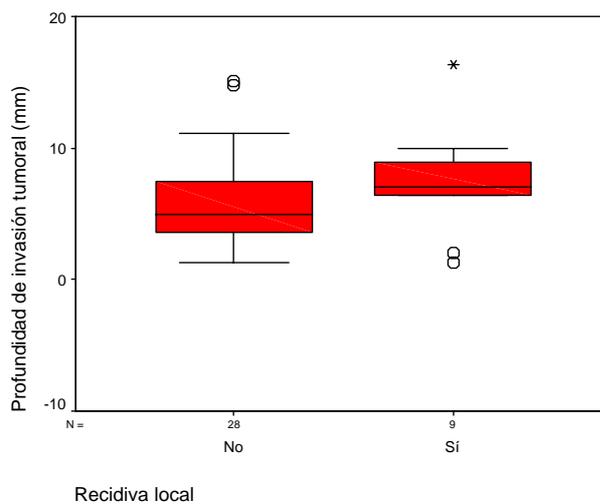


Figura 77: Profundidad de invasión del tumor según la aparición de recidivas locales

IV.7.B.d. Invasión Perineural

Los tumores con invasión perineural presentaron recidiva con más frecuencia que los tumores sin invasión perineural, sin embargo, esta relación no fue estadísticamente significativa ($\chi^2=2,294$, $p=0,130$; Test de Chi-cuadrado).

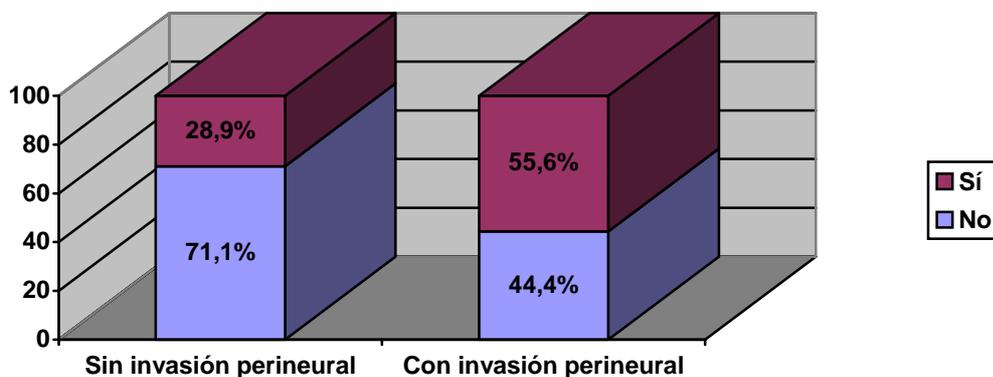


Figura 78: Aparición de recidivas locales en función de la presencia de invasión perineural

IV.7.B.e. Estado de los márgenes quirúrgicos

La incidencia de recidivas locales fue más alta en los pacientes con márgenes positivos en comparación con los pacientes con márgenes negativos, sin embargo, esta relación no fue estadísticamente significativa ($\chi^2=1,679$, $p=0,195$; Test de Chi-cuadrado).

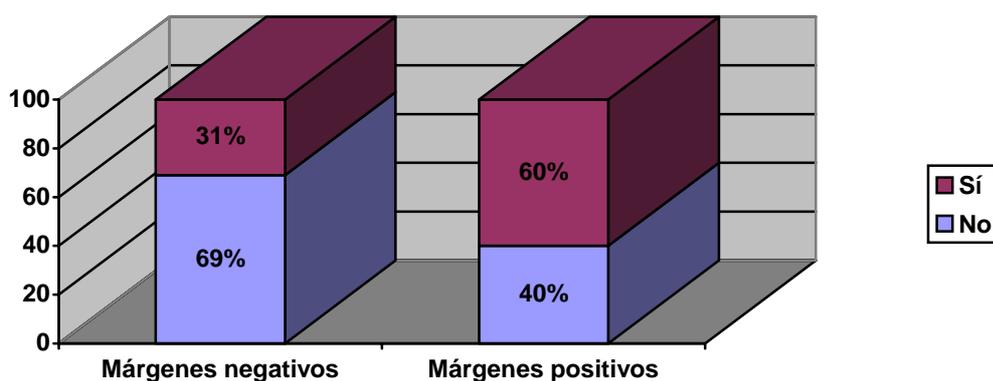


Figura 79: Aparición de recidivas locales en función del estado de los márgenes quirúrgicos

IV.7.C. Parámetros inmunohistoquímicos

IV.7.C.a. Índice de Proliferación Celular

El índice medio de proliferación celular de los tumores que presentaron recidiva local fue de $59,12\% \pm 18,71$, y de los tumores que no recurrieron localmente fue de $56,12\% \pm 15,36$. Esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p= 0,497$; Test T Student).

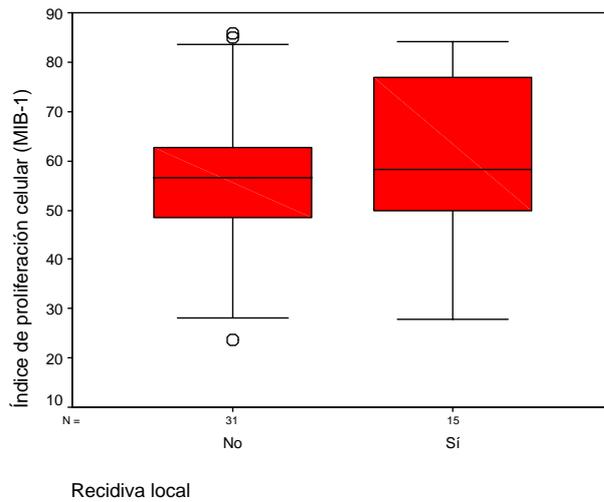


Figura 80: Distribución de MIB-1 según la aparición de recidivas locales

IV.7.C.b. Expresión de EGFR

No se encontró correlación entre la expresión de EGFR y las recidivas locales ($\chi^2=0,004$, $p= 0,952$; Test de Chi-cuadrado).

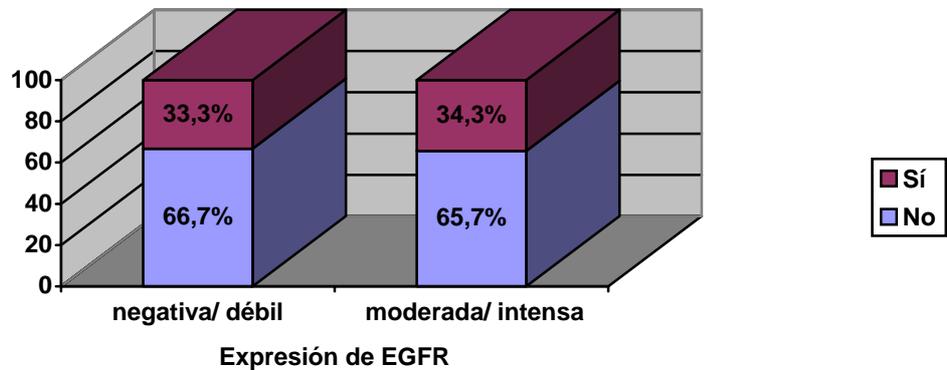


Figura 81: Aparición de recidivas locales en función de la expresión de EGFR

IV.7.C.c. Expresión de laminina 5 γ 2

No se encontró correlación entre la expresión de laminina 5 γ 2 y las recidivas locales ($\chi^2 = 0,69$, $p = 0,351$; Test de Chi-cuadrado).

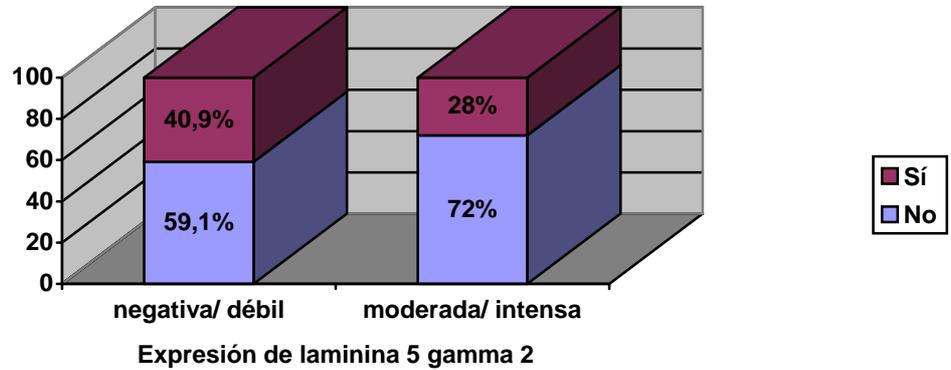


Figura 82: Aparición de recidivas locales en función de la expresión de laminina 5 γ 2

IV.7.C.d. Expresión de cadherina-E

No se encontró correlación entre la expresión de cadherina-E y las recidivas locales ($\chi^2 = 0,690$; $p = 0,406$; Test de Chi-cuadrado).

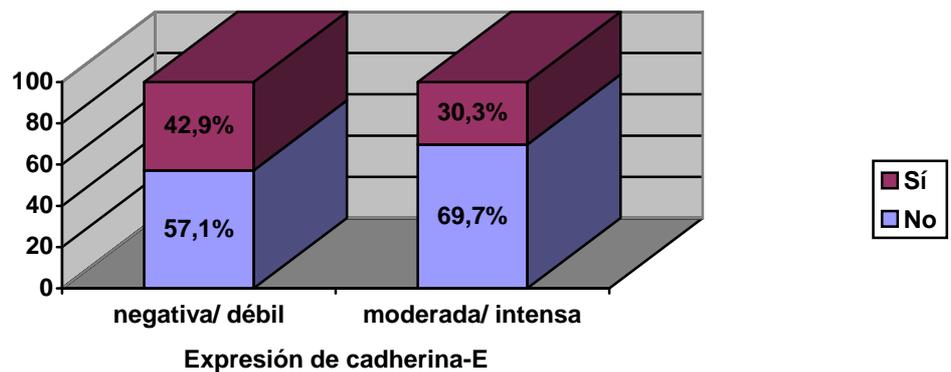


Figura 83: Aparición de recidivas locales en función de la expresión de cadherina-E

IV.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS RECIDIVAS REGIONALES

Como se describió en el apartado de material y métodos, en el presente estudio, las metástasis cervicales tardías, y recidivas de las metástasis cervicales fueron identificadas como recidivas regionales.

IV.8.A. Parámetros clínicos

IV.8.A.a. Edad

La media de edad de los pacientes que presentaron recidivas regionales fue de 55,77 años \pm 10,95, y de 55,55 años \pm 16,63 para los pacientes que no presentaron recidivas regionales. Esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0,443$; Test T de Student).

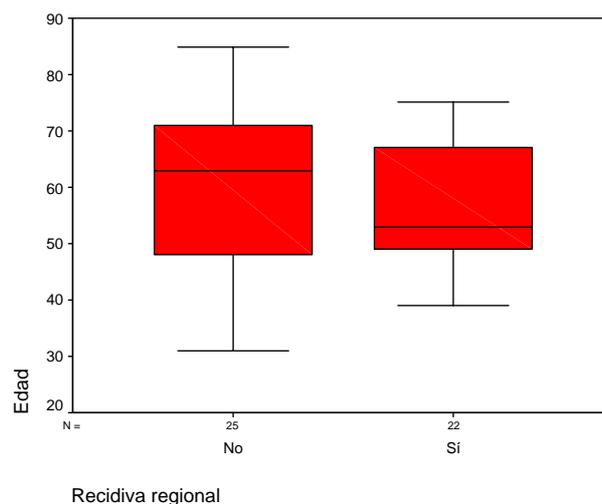


Figura 84: Edad de los pacientes en función de la aparición de recidivas regionales

Al valorar la aparición de metástasis regionales en los pacientes ≤ 45 años y > 45 años, nuevamente no se encontró asociación entre la edad y el desarrollo de recidivas regionales ($\chi^2=0,025$; $p=0,874$; Test de Chi-cuadrado).

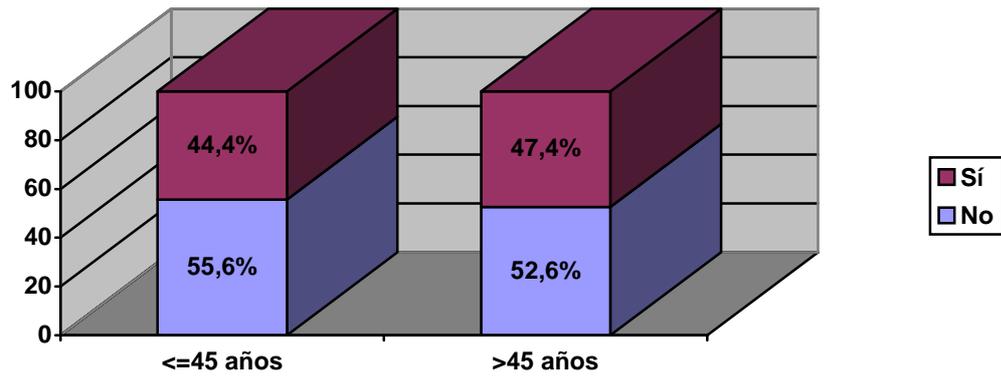


Figura 85: Aparición de recidivas regionales en función del rango de edad de los pacientes

IV.8.A.b. Sexo

Aunque la proporción de recidivas locales fue más alta en las mujeres, esta asociación no fue estadísticamente significativa ($\chi^2=0,351$; $p=0,553$; Test de Chi-cuadrado).

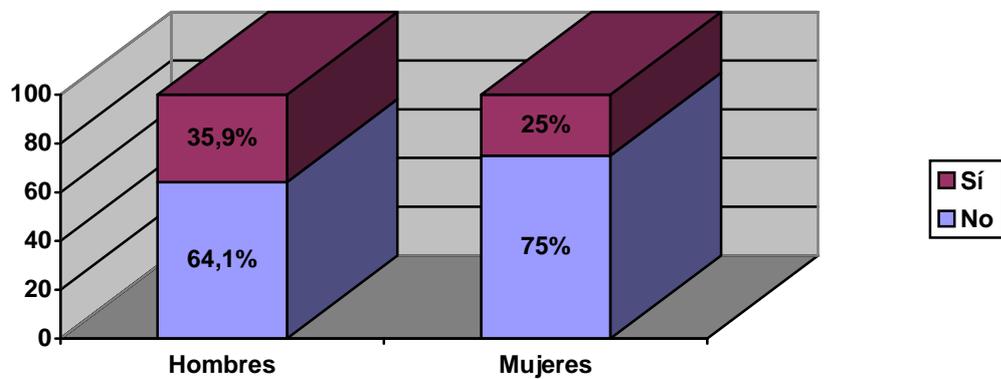


Figura 86: Aparición de recidivas regionales en función del sexo de los pacientes

IV.8.A.c. Localización

No se encontró asociación significativa entre la localización del tumor primario y la presencia de recidivas regionales ($\chi^2=3,404$; $p=0,638$; Test de Chi-cuadrado).

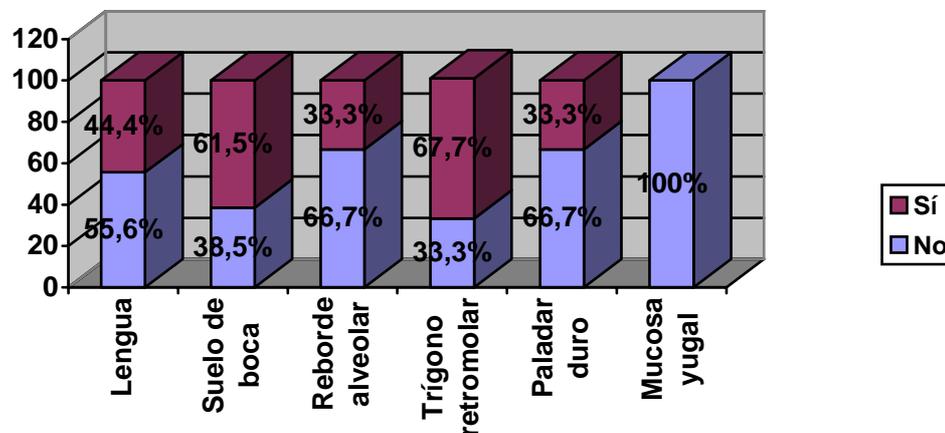


Figura 87: Aparición de recidivas regionales en función de la localización del tumor primario

IV.8.A.d. Estadio TNM

Tamaño del tumor primario (estadio T)

Los tumores de mayor tamaño presentaron recidivas regionales con una frecuencia más alta. Sin embargo, esta asociación no fue estadísticamente significativa ($\chi^2=2,785$; $p=4,26$; Test de Chi-cuadrado).

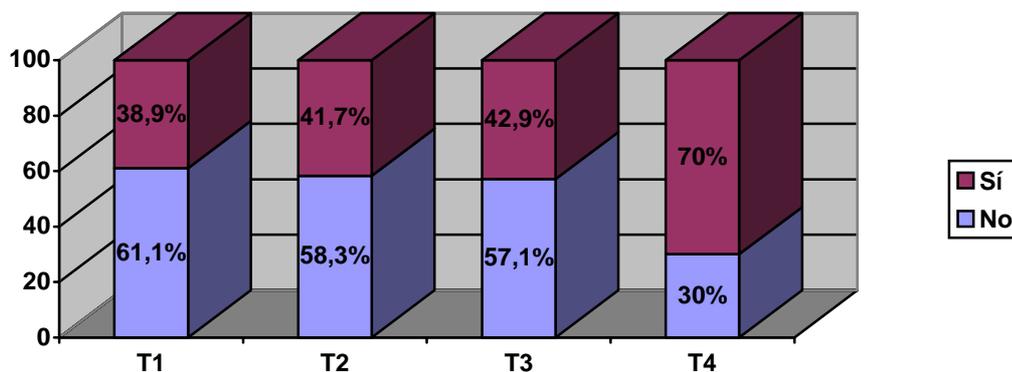


Figura 88: Aparición de recidivas regionales en función del tamaño del tumor primario

Ganglios linfáticos cervicales (estadio N)

No se encontró asociación entre el estadio N y la aparición de recidivas regionales ($\chi^2=2,590$; $p=0,274$; Test de Chi-cuadrado).

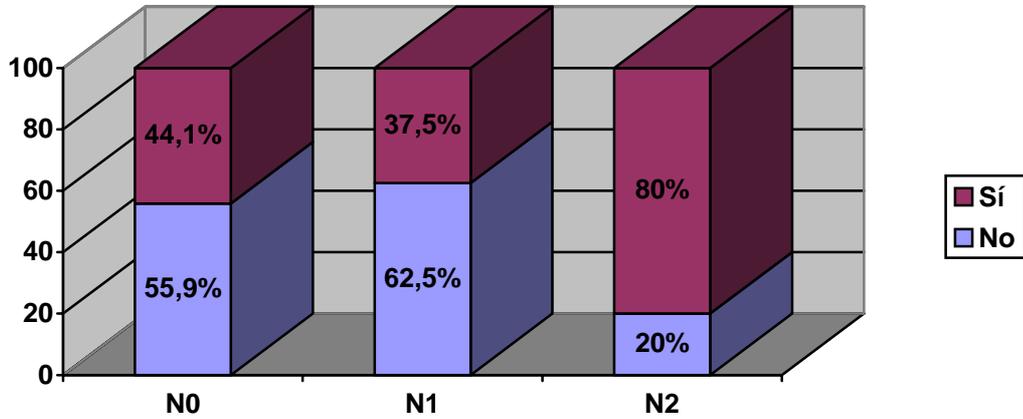


Figura 89: Aparición de recidivas regionales en función del estadio N

IV.8.A.e. Estadio clínico

Los tumores en estadios clínicos más avanzados presentaron recidivas regionales con una frecuencia más alta. Sin embargo, esta asociación no fue estadísticamente significativa ($\chi^2=5,284$; $p=0,426$; Test de Chi-cuadrado).

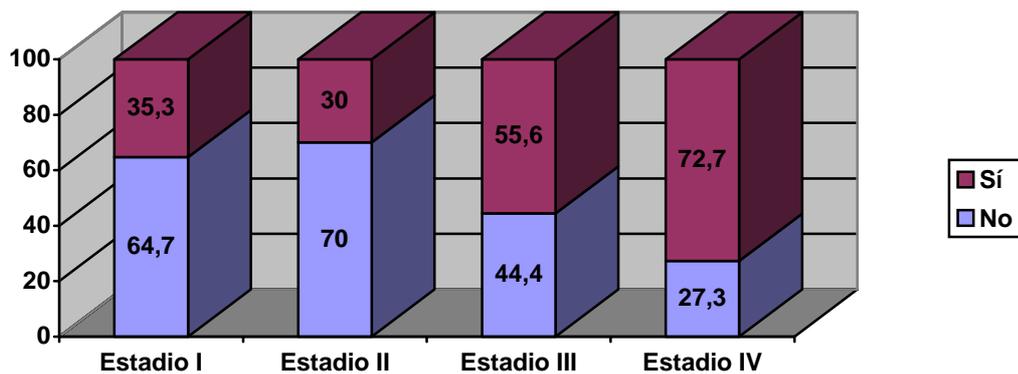


Figura 90: Aparición de recidivas regionales en función del estadio clínico

IV.8.A.f. Tratamiento del tumor primario

No se encontró una asociación entre la aparición de recidivas regionales y el tratamiento del tumor primario ($\chi^2=0,066$; $p=0,717$; Test de Chi-cuadrado).

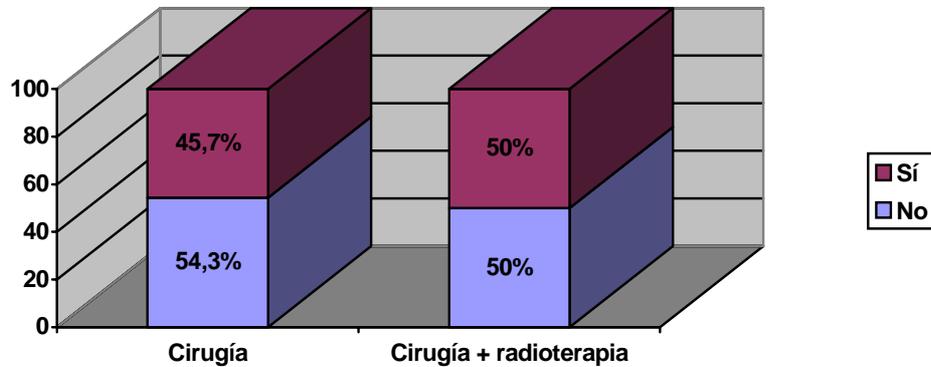


Figura 91: Aparición de recidivas regionales en función del tratamiento del tumor primario

IV.8.B. Parámetros histológicos

IV.8.B.a. Grado de diferenciación histológica

Los tumores moderadamente diferenciados presentaron recidivas regionales con más frecuencia que los tumores bien diferenciados. Sin embargo, esta asociación no fue estadísticamente significativa ($\chi^2=1,812$; $p=0,178$; Test de Chi-cuadrado).

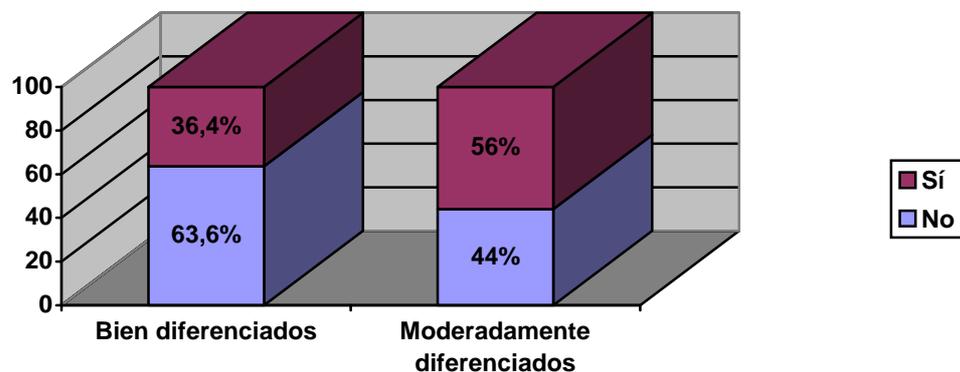


Figura 92: Aparición de recidivas regionales en función del grado de diferenciación histológica

IV.8.B.b. Modo de Invasión Tumoral

Los tumores con un patrón histológico más invasivo presentaron una frecuencia más alta de recidivas regionales en comparación con los tumores con un patrón menos invasivo. Sin embargo, esta asociación no fue estadísticamente significativa ($\chi^2=2,506$; $p=0,113$; Test de Chi-cuadrado).

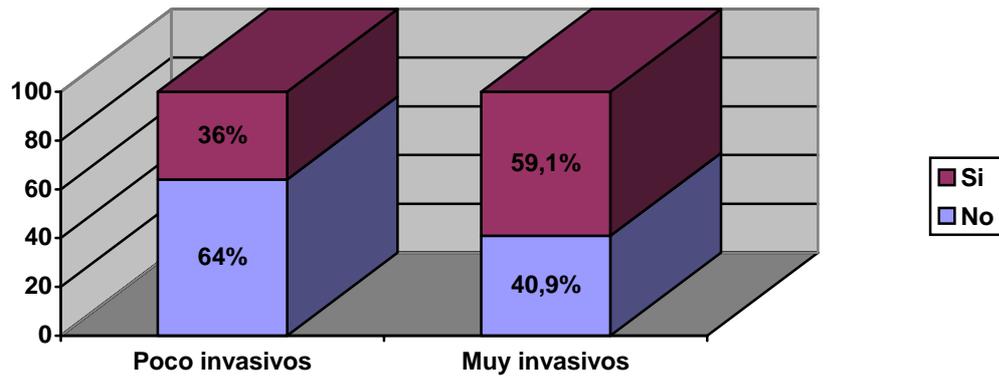


Figura 93: Aparición de recidivas regionales en función del modo de invasión tumoral

IV.8.B.c. Profundidad de invasión

La profundidad de invasión media de los tumores que presentaron recidivas regionales fue de $6,37\text{mm} \pm 4,19$, y de $6,30\text{ mm} \pm 3,23$ en los tumores que no presentaron recidivas regionales. Esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0,953$; Test T de Student).

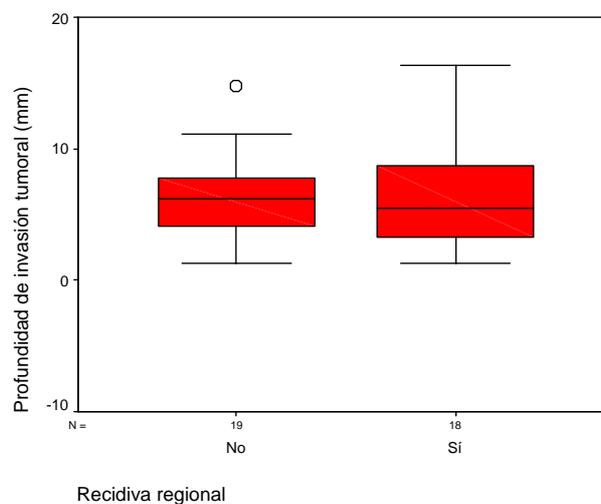


Figura 94: Profundidad de invasión en función de la aparición de recidivas regionales

IV.8.B.d. Invasión Perineural

No se encontró diferencia en la incidencia de recidivas regionales entre los tumores con o sin invasión perineural. ($\chi^2=0,812$, $p= 0,368$; Test de Chi-cuadrado)

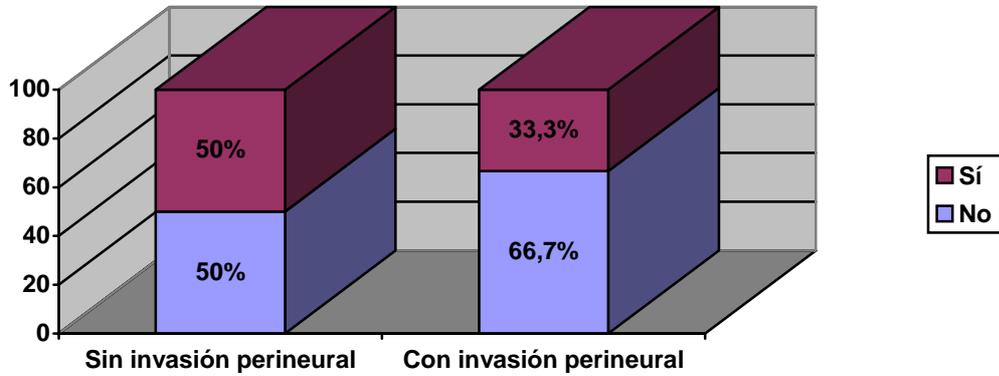


Figura 95: Aparición de recidivas regionales en función de la presencia de invasión perineural

IV.8.B.e. Estado de los márgenes quirúrgicos

No se encontró asociación entre el estado de los márgenes quirúrgicos y la incidencia de recidivas regionales ($\chi^2=0,274$, $p= 0,601$; Test de Chi-cuadrado).

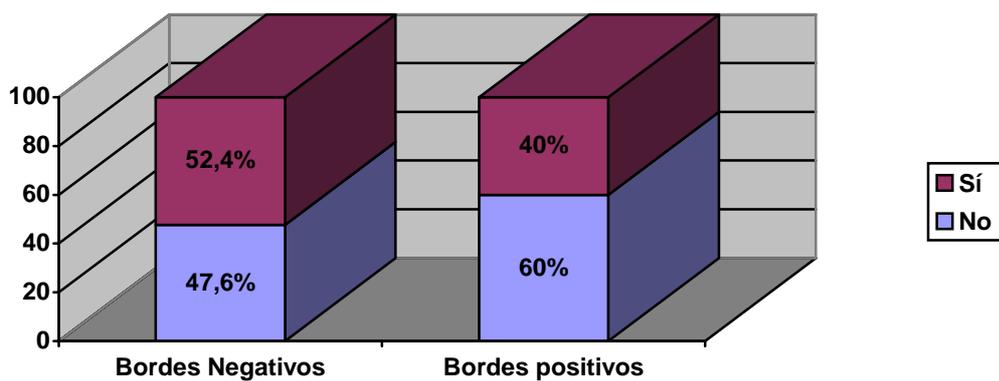


Figura 96: Aparición de recidivas regionales en función del estado de los márgenes quirúrgicos

IV.8.C. Parámetros inmunohistoquímicos

IV.8.C.a. Índice de proliferación celular (MIB-1)

El índice de proliferación medio de los tumores en pacientes que presentaron recidivas regionales fue de $59,33 \pm 16,29$, y de $55,55 \pm 16,63$ en los pacientes que no presentaron recidivas regionales. Esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0,443$; Test T de Student).

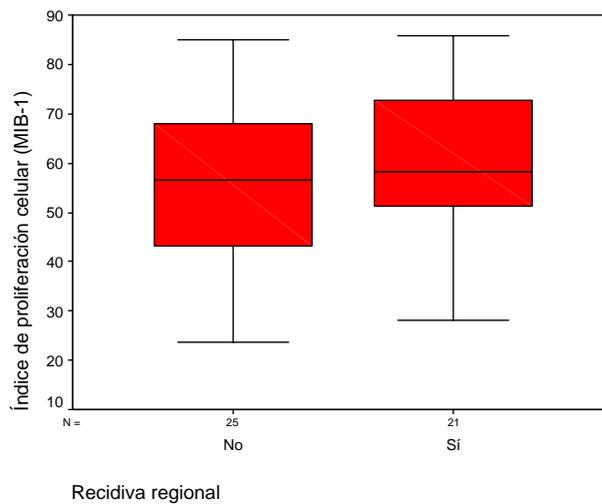


Figura 97: Distribución de MIB-1 según la aparición de recidivas regionales

IV.8.C.b. Expresión de EGFR

No se encontró asociación entre la expresión de EGFR y la aparición de recidivas regionales ($\chi^2=0,066$, $p= 0,797$, Test de Chi-cuadrado).

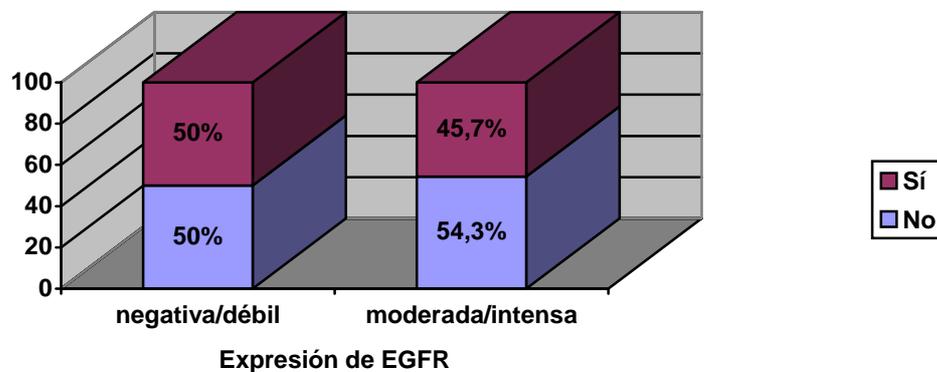


Figura 98: Aparición de recidivas regionales en función de la expresión de EGFR

IV.8.C.c. Expresión de laminina 5 γ 2

No se encontró asociación entre la expresión de laminina 5 γ 2 y la aparición de recidivas regionales. ($\chi^2=0,030$, $p=0,861$; Test de Chi-cuadrado)

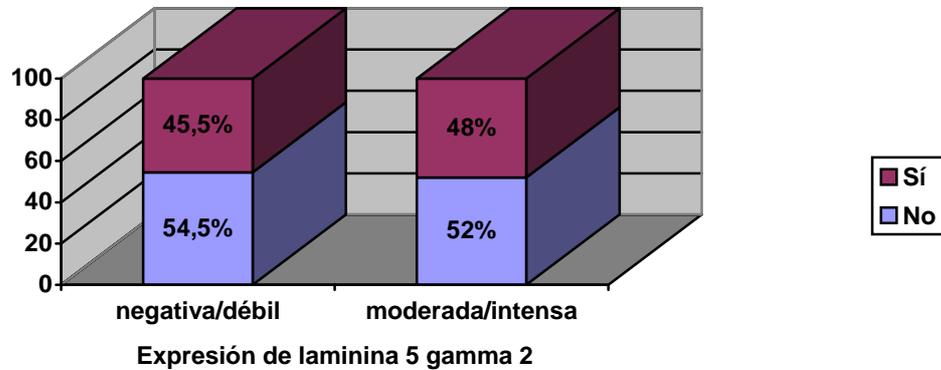


Figura 99: Aparición de recidivas regionales en función de la expresión de laminina 5 γ 2

IV.8.C.d. Expresión de cadherina-E

Se encontró una fuerte asociación entre la expresión de cadherina-E y la presencia de recidivas regionales. Los pacientes con tumores con expresión negativa/débil de cadherina-E presentaron recidivas regionales con una frecuencia mucho más alta (85,7%) que los pacientes con tumores con expresión moderada/intensa (30,3%). Solamente 2 pacientes (14,3%) con expresión negativa/débil no presentaron recidivas regionales ($\chi^2=12,12$, $p=0,000$; Test de Chi-cuadrado).

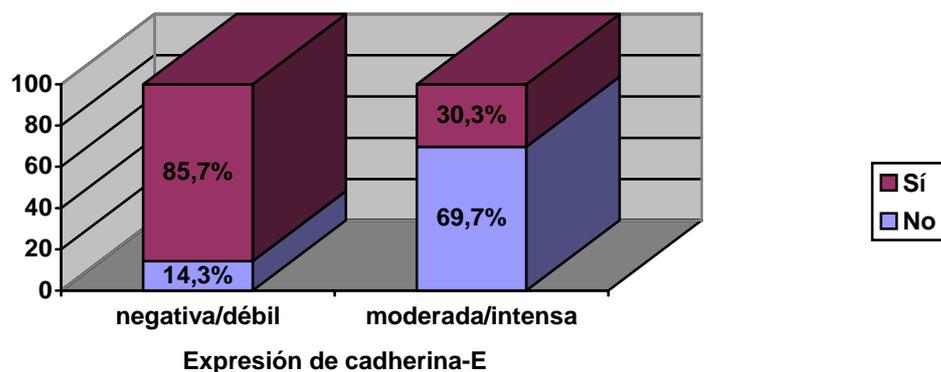


Figura 100: Aparición de recidivas regionales en función de la expresión de cadherina-E

IV.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL INTERVALO LIBRE DE ENFERMEDAD

Hemos considerado el intervalo libre de enfermedad como el periodo de tiempo existente desde el tratamiento del tumor primario y la enfermedad cervical asociada en el caso de cuellos N+, y la aparición de recidivas locales, regionales o a distancia, o la aparición de metástasis cervicales tardías en pacientes sin afectación de los ganglios linfáticos (N0) en el momento del diagnóstico. En aquellos pacientes que no presentaron recidivas, este periodo se ha definido como el periodo desde el tratamiento inicial hasta el fin del seguimiento.

La media del intervalo libre de enfermedad fue de 27 meses \pm 22,92 (rango 2-108 meses). La asociación entre el intervalo libre de enfermedad y las distintas variables estudiadas se puede observar en las tablas 15 y 16.

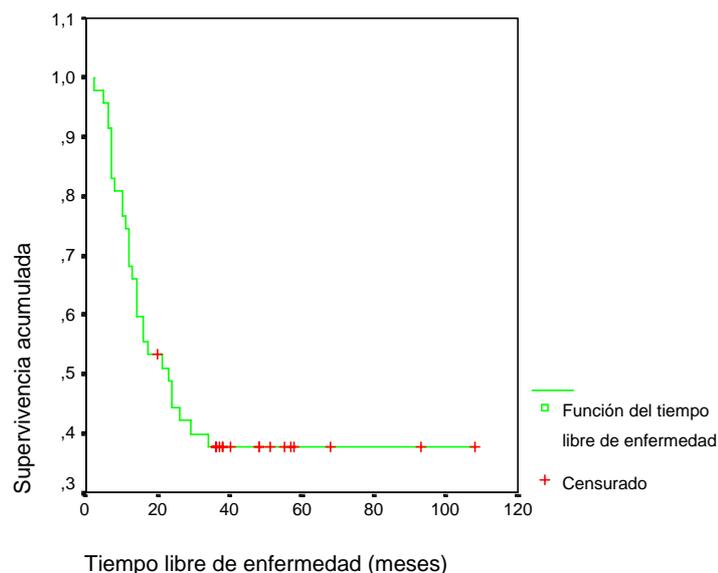


Figura 101: Función del intervalo libre de enfermedad para el grupo de 47 pacientes

IV.9.A. Parámetros clínicos

IV.9.A.a. Edad

No se encontró una asociación significativa entre el intervalo libre de enfermedad y la edad de los pacientes (Exp (β)= 0,997, $p=0,830$; Regresión de Cox). El intervalo libre de enfermedad medio para los pacientes ≤ 45 y >45 años fue de 32 meses

(16,72-47,73) y 48 meses (33,77-62, 81), respectivamente. Esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0,793$; Log Rank Test).

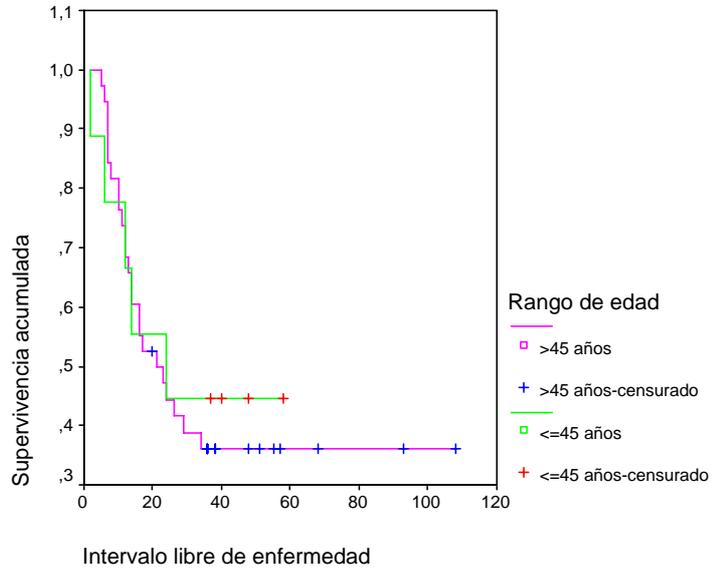


Figura 102: Función del intervalo libre de enfermedad y rango de edad

IV.9.A.b. Sexo

El sexo de los pacientes no mostró correlación con el intervalo libre de enfermedad ($p=0,489$; Log Rank Test).

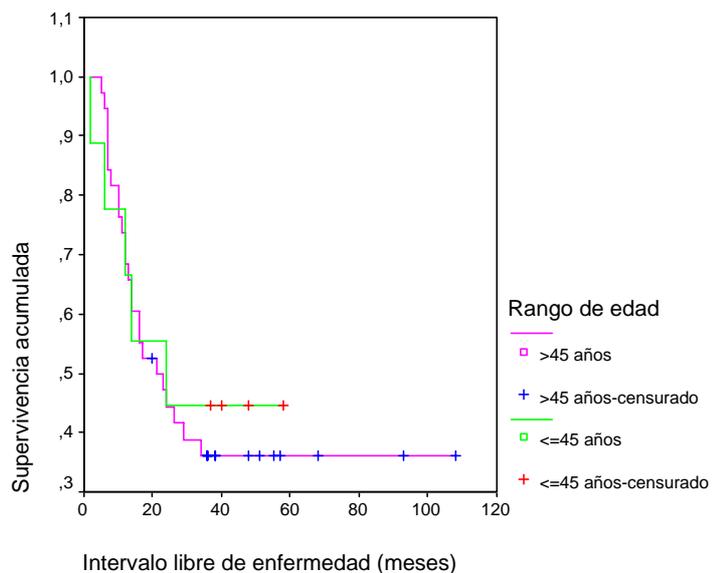


Figura 103: Función del intervalo libre de enfermedad y sexo de los pacientes

IV.9.A.c. Localización

No se encontraron diferencias significativas en el intervalo libre de enfermedad entre las distintas localizaciones ($p=0,604$; Log Rank Test).

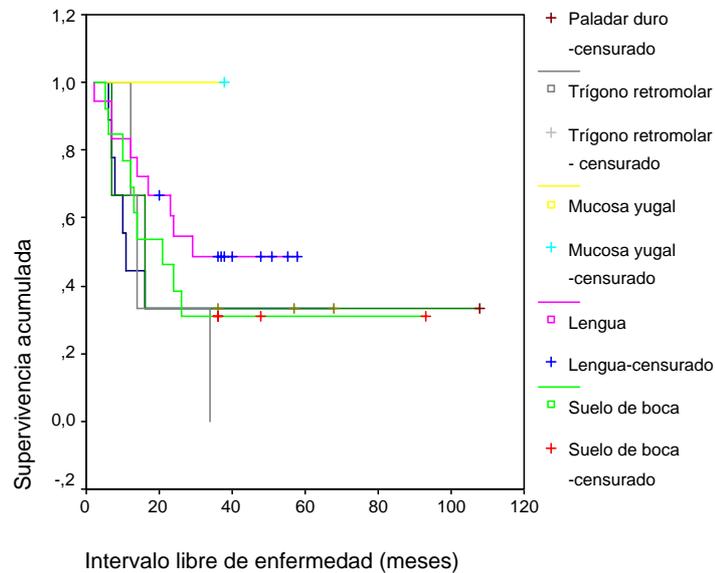


Figura 104: Función del intervalo libre de enfermedad y localización del tumor primario

IV.8.A. d. Estadío TNM

Tamaño del tumor primario (estadio T)

El tamaño del tumor primario se relacionó con el intervalo libre de enfermedad de modo estadísticamente significativo ($p=0,0023$; Log Rank Test). De forma más precisa se puede decir que cuanto mayor el tamaño de la lesión, más corto el intervalo libre de enfermedad en este grupo de pacientes.

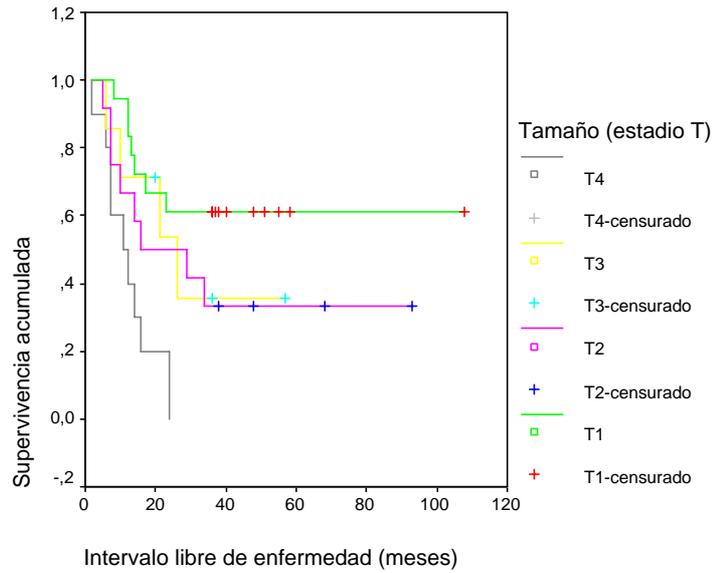


Figura 105: Función del intervalo libre de enfermedad y tamaño del tumor primario

Ganglios linfáticos cervicales (estadio N)

El grado de afectación de los ganglios linfáticos cervicales en el momento del diagnóstico se correlacionó significativamente con el intervalo libre de enfermedad; a mayor grado de afectación menor, el tiempo libre de enfermedad ($p=0,0170$; Log Rank Test).

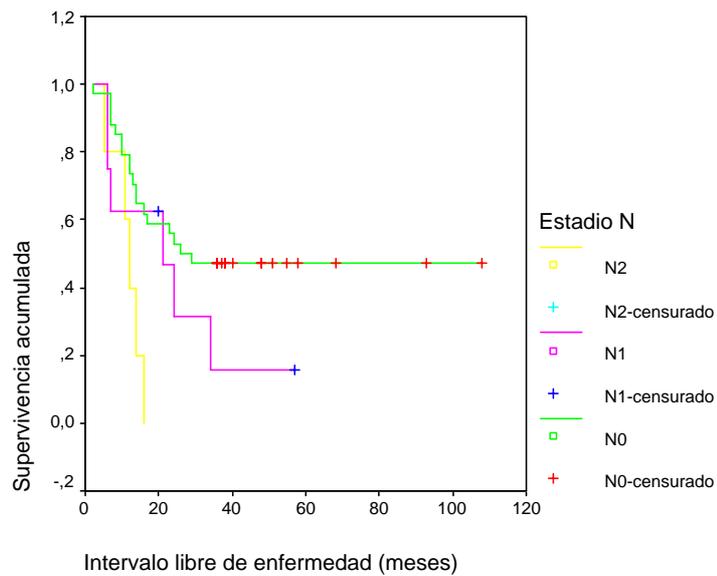


Figura 106: Función del intervalo libre de enfermedad y estadio N

IV.9.A.e. Estadio Clínico

El estadio clínico del tumor demostró una fuerte relación con el intervalo libre de enfermedad; a estadios más avanzados, menor el intervalo libre de enfermedad ($p=0,0003$; Log Rank Test)

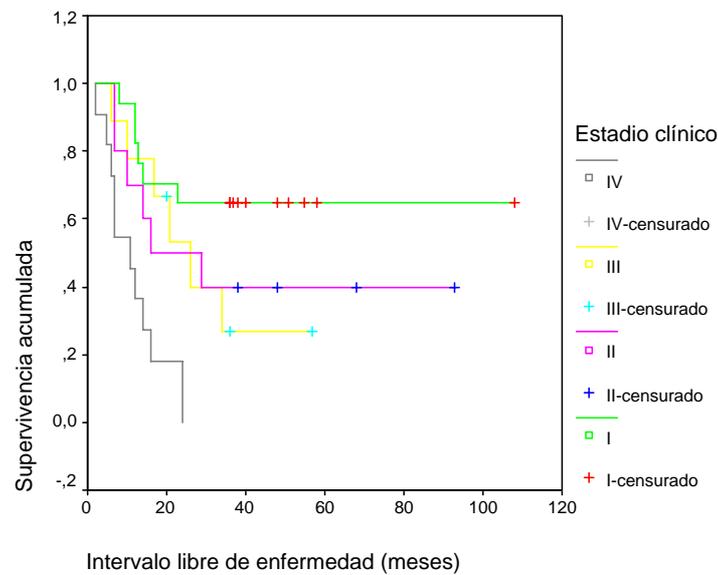


Figura 107: Función del intervalo libre de enfermedad y estadio clínico

IV.9.A.f. Tratamiento del tumor primario

El intervalo libre de enfermedad medio de los pacientes tratados inicialmente con cirugía fue de 55,17 meses (39,88-70,47) y de 29 meses (8,91-49,76) en los pacientes tratados inicialmente con cirugía más radioterapia. Esta diferencia fue cercana a la significación estadística ($p= 0,0589$; Log Rank Test).

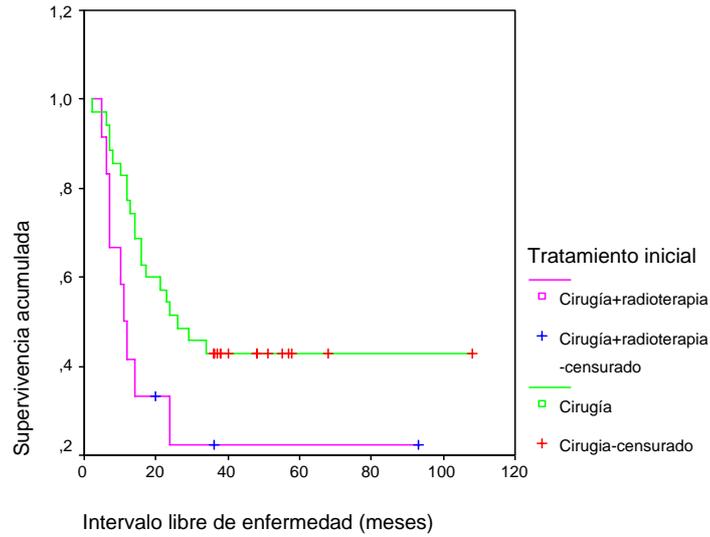


Figura 108: Función del intervalo libre de enfermedad y tratamiento del tumor primario

IV.9.B. Parámetros Histológicos

IV.9.B.a. Grado de diferenciación histológica

El grado de diferenciación histológica se correlacionó con el intervalo libre de enfermedad; los tumores moderadamente diferenciados presentaron un intervalo libre de enfermedad significativamente menor que los tumores bien diferenciados ($p=0,0094$; Log Rank Test).

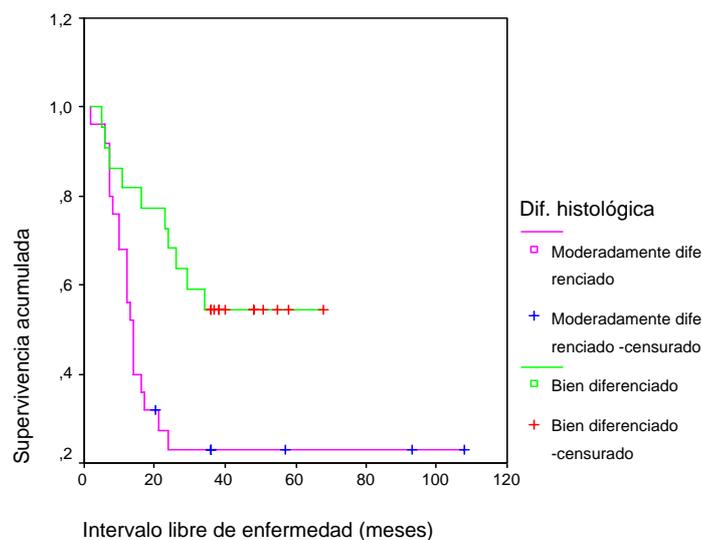


Figura 109: Función del intervalo libre de enfermedad y grado de diferenciación histológica

IV.9.B.b. Modo de invasión tumoral

No se encontró una relación significativa entre el modo de invasión tumoral y el intervalo libre de enfermedad ($p=0,1564$; Log Rank Test).

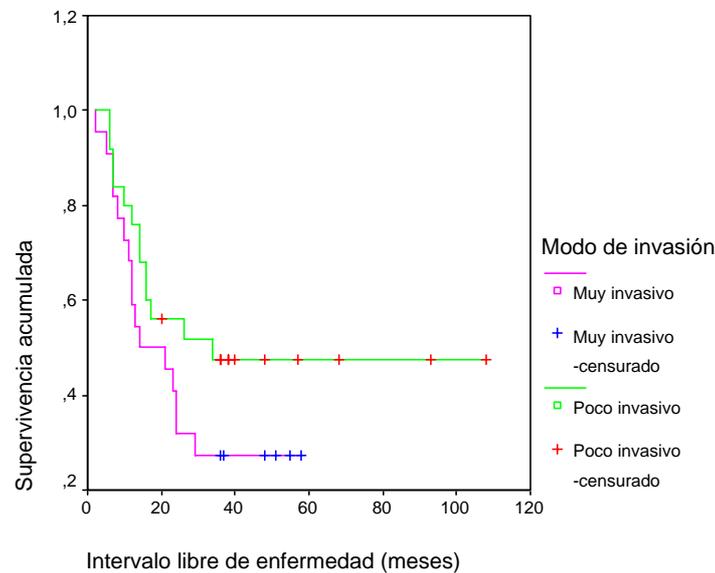


Figura 110: Función del intervalo libre de enfermedad y modo de invasión tumoral

IV.9.B.c. Profundidad de invasión tumoral

La profundidad de invasión tumoral no se correlacionó con el intervalo libre de enfermedad ($\text{Exp}(\beta)=1,056$, $p=0,406$; Regresión de Cox). Para profundizar el análisis de la relación entre el intervalo libre de enfermedad se ha estudiado diversos valores de cortes, sin embargo, ninguno ha resultado estadísticamente significativo

IV.9.B.d. Invasión perineural

La media del intervalo libre de enfermedad en los pacientes con tumores con invasión perineural fue 30,97 meses (14,93-47,02) y de 49,08 meses (34,66-63,50) para los pacientes con tumores sin invasión perineural. Esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0,9450$; Log Rank Test).

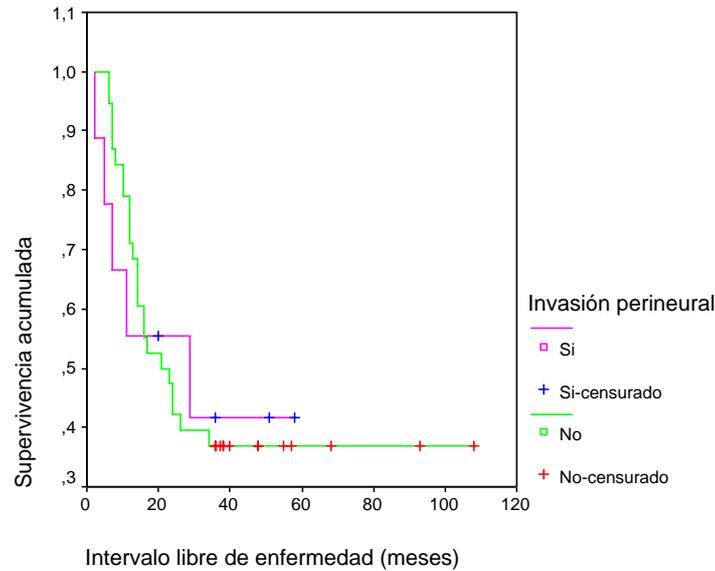


Figura 111: Función del intervalo libre de enfermedad e invasión perineural

IV.9.B.e. Estado de los bordes quirúrgicos

La presencia de infiltración neoplásica en los bordes de la pieza quirúrgica demostró una correlación significativa con un intervalo libre de enfermedad reducido ($p=0,039$; Log Rank Test). La media del intervalo libre de enfermedad en los pacientes con márgenes quirúrgicos positivos fue de 13 meses (2,84-23,16) en comparación con los 52,12 meses (38,15-66,03) para los pacientes con márgenes quirúrgicos negativos.

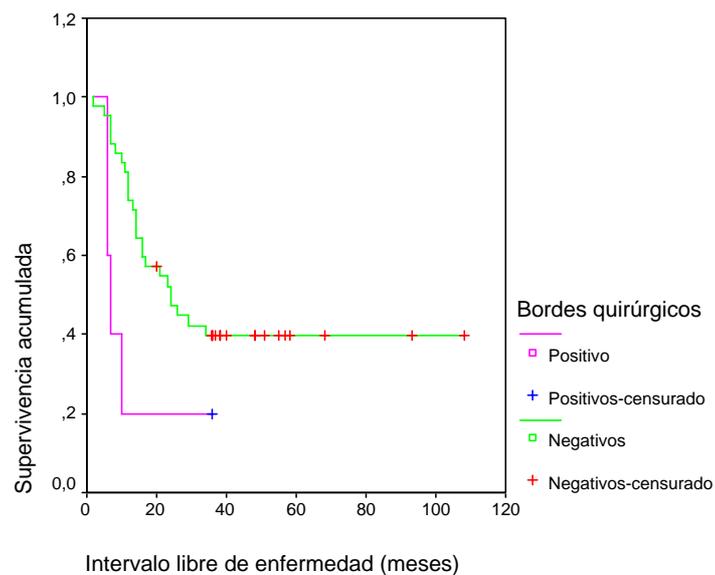


Figura 112: Función del intervalo libre de enfermedad y estado de los márgenes quirúrgicos

IV.8.C. Parámetros Inmunohistoquímicos

IV.8.C.a. Índice de proliferación celular (MIB-1)

No encontramos una asociación estadística entre el intervalo libre de enfermedad y el índice de proliferación celular ($\text{Exp}(\beta)=1,006$, $p=0,651$; Regresión de Cox).

IV.9.C.b. Expresión de EGFR

No se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre el tiempo libre de enfermedad de los pacientes con tumores con expresión negativa/débil de EGFR (50,25 meses; 29,41-71,09) y de los pacientes con expresión moderada/intensa (47,32 meses; 31,85-62,80) ($p=0,454$; Log Rank Test).

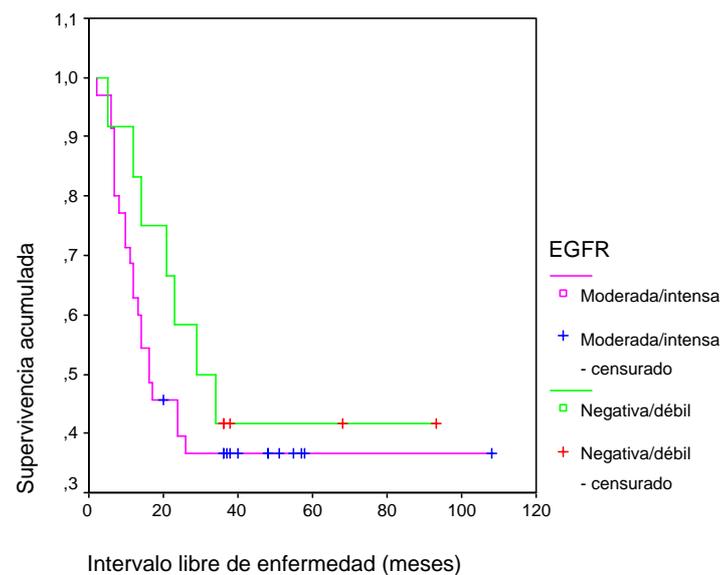


Figura 113: Función del intervalo libre de enfermedad y expresión de EGFR

IV.9.C.c. Expresión de Laminina 5 γ 2

No se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre el tiempo libre de enfermedad en los pacientes con tumores con expresión negativa/débil de laminina 5 γ 2 (45,01 meses; 28,35-61,68) y en los pacientes con expresión moderada/intensa (48,28 meses; 30,53-66,03) ($p=0,9012$; Log Rank Test).

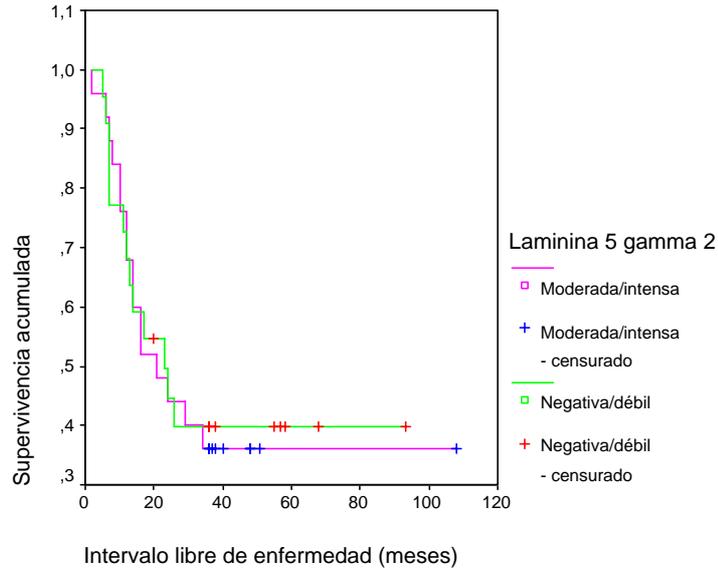


Figura 114: Función del intervalo libre de enfermedad y expresión de laminina 5 γ 2

IV.9.C.D. Expresión de cadherina-E

Los pacientes con tumores con expresión negativa/débil de cadherina-E presentaron un intervalo libre de enfermedad significativamente más corto (16,86 meses; 9,57-24,15) que los pacientes con tumores con expresión moderada/ intensa de cadherina-E (62,08 meses; 45,90-78,20) ($p=0,0014$; Log Rank Test).

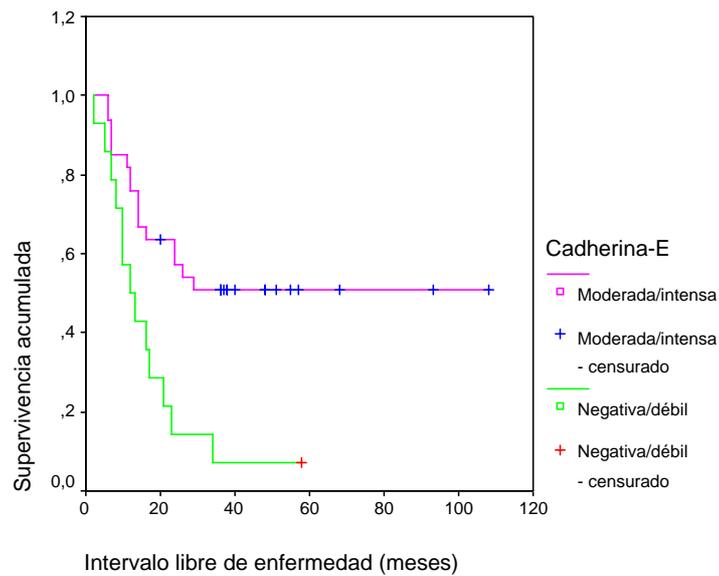


Figura 115: Función del intervalo libre de enfermedad y expresión de cadherina-E

Variable	N	Media	Intervalo de confianza de 95%		p
Rango de edad					
≤ 45 años	9	32,22	16,72	47,73	0,7935
> 45 años	38	48,29	33,77	62,81	
Sexo					
- Hombre	39	47,19	32,88	61,49	0,4892
- Mujer	8	35,25	19,42	51,08	
Localización					
- Lengua	18	36,01	25,61	48,40	0,6043
- Suelo de boca	13	38,69	18,75	58,64	
- Reborde alveolar	9	29,11	11,06	47,16	
- Trígono retromolar	3	20,00	6,23	33,77	
- Paladar duro	3	43,67	0	95,31	
- Mucosa yugal	1	38,00	-	-	
Tamaño del tumor primario (estadio T)					
- T1	18	71,50	50,32	92,68	0,0023
- T2	12	41,17	19,91	62,42	
- T3	7	31,04	15,03	47,04	
- T4	10	12,30	7,71	16,89	
Ganglios linfáticos cervicales (estadio N)					
- N0	34	58,21	42,33	74,08	0,0170
- N1	8	23,63	10,94	36,31	
- N2	5	11,60	7,95	15,25	
Estadio clínico					
- Estadio I	17	74,71	53,24	96,17	0,0003
- Estadio II	10	45,50	21,19	69,81	
- Estadio III	9	29,67	17,14	42,19	
- Estadio IV	11	11,64	7,28	15,99	
Tratamiento del tumor primario					
- Cirugía	35	55,17	39,88	70,47	0,0589
- Cirugía + Radioterapia	12	29,33	8,91	49,76	
Grado de diferenciación histológica					
- Bien diferenciado	22	45,32	34,56	56,07	0,0094
- Moderadamente diferenciado	25	33,98	17,76	50,21	
Modo de invasión tumoral					
- Poco invasivo	25	58,76	40,16	77,36	0,1564
- Muy invasivo	22	25,91	17,25	34,57	
Estado márgenes quirúrgicos					
- Márgenes negativos	42	52,12	38,15	66,09	0,0399
- Márgenes positivos	5	13,00	2,84	23,16	
Invasión perineural					
- Sin invasión	38	49,09	34,66	63,50	0,9450
- Con invasión	9	30,97	40,93	47,02	

Variable	N	Media	Intervalo de confianza de 95%		p
Expresión EGFR					
- Negativa/débil	12	50,25	29,41	71,09	0,4544
- Moderada/intensa	35	47,32	31,85	62,80	
Expresión laminina 5 γ2					
- negativa/débil	22	45,01	28,35	61,68	0,9012
- Moderada/intensa	25	48,28	30,53	66,03	
Expresión cadherina-E					
- Negativa/débil	14	16,86	9,57	24,15	0,0014
- Moderada/intensa	33	62,08	45,90	78,26	

Tabla 15: Media del intervalo libre de enfermedad, intervalo de confianza y valor de significación (p) para las distintas variables categóricas según el método de Kaplan Meier.

Variable	N	Exp (β)	Intervalo de Confianza del 95%		p
Edad	47	0,997	0,971	1,024	0,830
Profundidad de invasión tumoral	37	1,056	0,928	1,202	0,406
Índice de proliferación (MIB-1)	46	1,006	0,981	1,031	0,651

Tabla 16: Valores de asociación entre las variables cuantitativas continuas y el intervalo libre de enfermedad mediante regresión de Cox.

IV.9.D. Análisis multivariante del tiempo libre de enfermedad

El análisis multivariante mediante el modelo de riesgo proporcional de Cox, incluyendo el tamaño tumoral, estadio N, estadio clínico, diferenciación histológica, estado de los márgenes quirúrgicos y expresión de cadherina-E, demostró que solamente el estadio clínico, el estado de los márgenes quirúrgicos y la expresión de cadherina-E tienen valor pronóstico independiente del intervalo libre de enfermedad.

Variable	Exp (β)	Sig	IC 95% exp (β)	
			Inferior	Superior
Estadio I/Estadio II	2,605	0,103	0,823	8,605
Estadio II/Estadio III	1,833	0,311	0,567	5,925
Estadio III/EstadioIV	8,537	0,000	2,969	24,552
Márgenes quirúrgicos				
negativo/positivo	3,693	0,028	1,150	11,863
Expresión de cadherina-E				
(moderada/intensa)/(negativa/débil)	4,018	0,001	1,814	8,898

Tabla 17: Resultados del análisis multivariante mediante el modelo de riesgo proporcional de Cox.

IV.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA SUPERVIVENCIA

Al analizar la supervivencia del grupo de pacientes estudiados observamos que la media de supervivencia fue de 55,35 meses con un intervalo de confianza del 95% de 42-68 meses. La asociación entre la supervivencia y las distintas variables estudiadas se puede observar en las tablas 18 y 19.

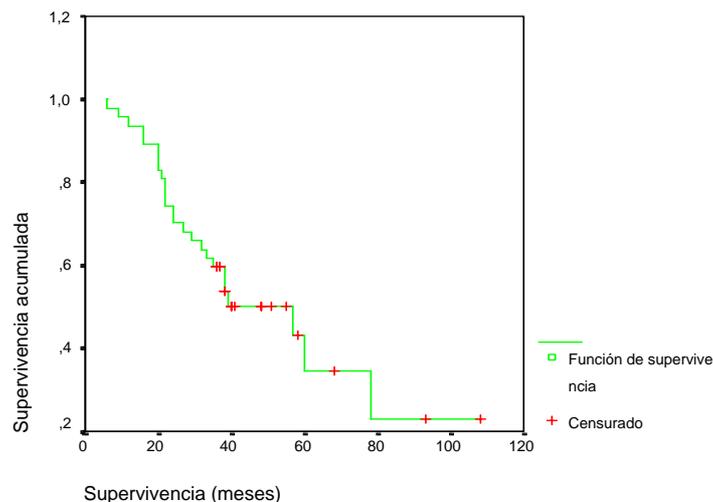


Figura 116: Función de supervivencia para el grupo de 47 pacientes

IV.10.A. Parámetros clínicos

IV.10.A.a. Edad

No se observó relación entre la edad y la supervivencia. ($\text{Exp}(\beta) = 0,994$, $p = 0,682$; Regresión de Cox). Así mismo, para el análisis de las curvas de supervivencia mediante el método de Kaplan Meier, se ha dividido los pacientes en dos grupos según la edad: pacientes \leq de 45 años y pacientes $>$ de 45 años. Los pacientes \leq de 45 años presentaron una media de supervivencia de 37,33 meses (25,06-49,61), frente a una media de supervivencia de 59,19 meses (42,32-70,04) para los pacientes $>$ de 45 años; sin embargo, la diferencia entre los dos grupos no fue significativa ($p = 0,56$; Log Rank Test).

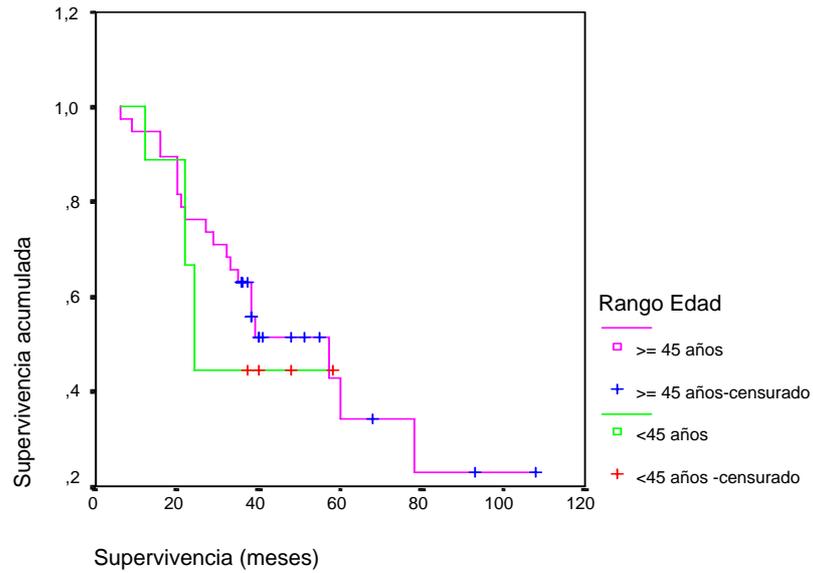


Figura 117: Función de supervivencia y rango de edad

IV.10.A.b. Sexo

El tiempo medio de supervivencia para los hombres fue de 51,90 meses (38,68-65,12) mientras para las mujeres fue de 50,63 (41,91-59,34). Esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0,145$, Log Rank Test).

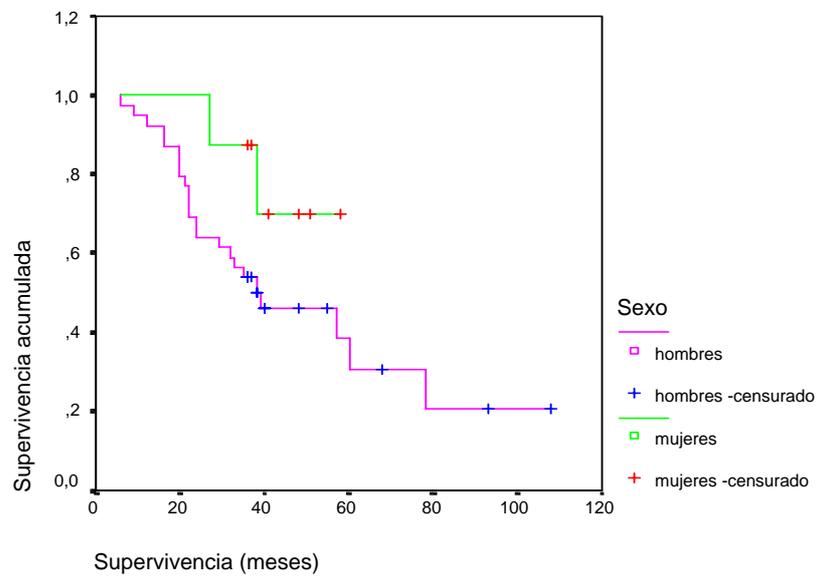


Figura 118: Función de supervivencia y sexo de los pacientes

IV.10.A.c. Localización

No se encontraron diferencias significativas en la supervivencia de los pacientes según la localización primaria del tumor ($p=0,877$; Log Rank Test).

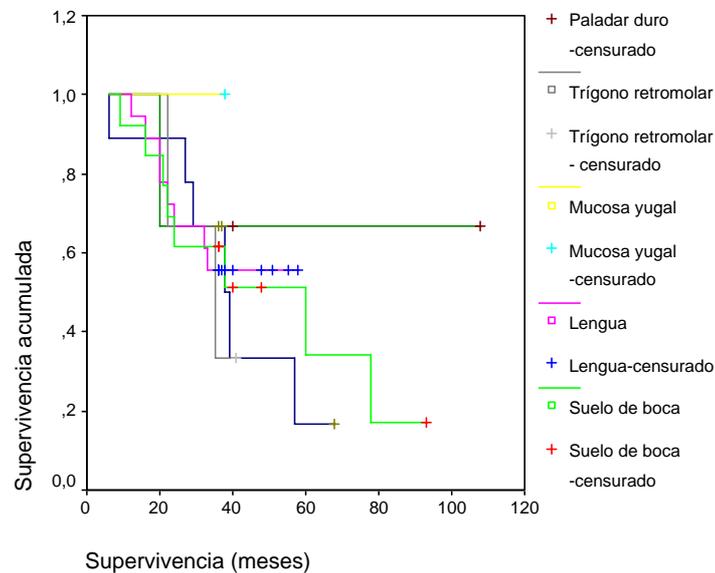


Figura 119: Función de supervivencia y localización del tumor primario

IV.10.A.d. Estadio TNM

Tamaño tumor primario (T)

Al estimar las curvas de supervivencia mediante el método de Kaplan Meier se observaron unas medias de supervivencia de 73,19 meses (52,58-93,80) para los tumores T1, 63,64 meses (43,80-83,48) para los tumores T2, 36,64 meses (21,15-52,13) para los tumores T3 y 25,60 meses (18,55- 32, 65) para los tumores T4. Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p= 0,0092$, Log Rank Test).

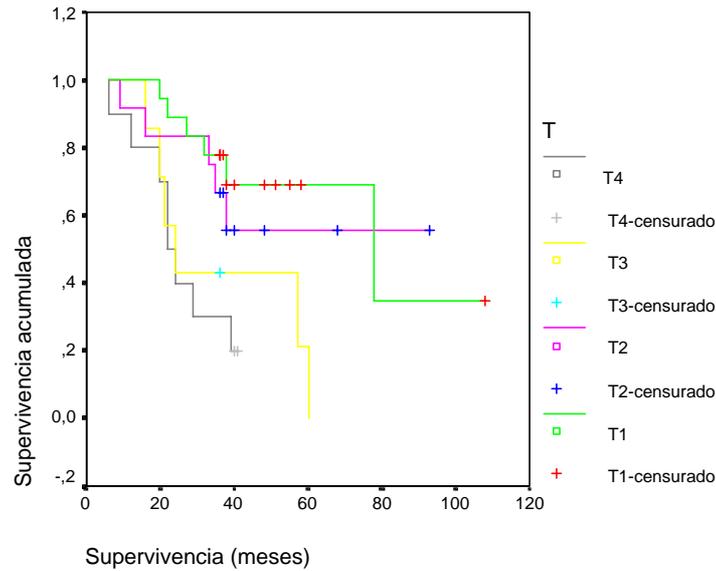


Figura 120: Función de supervivencia y tamaño del tumor primario

Ganglios Linfáticos Cervicales (estadio N)

Los pacientes sin adenopatías cervicales palpables (N0) el momento del diagnóstico presentaron un tiempo de supervivencia significativamente más largo (67,82 meses, 51,56-84,04) que los pacientes con adenopatías clínicamente palpables (27,92 meses, 19,38-36,47) ($p=0,0001$, Log Rank Test).

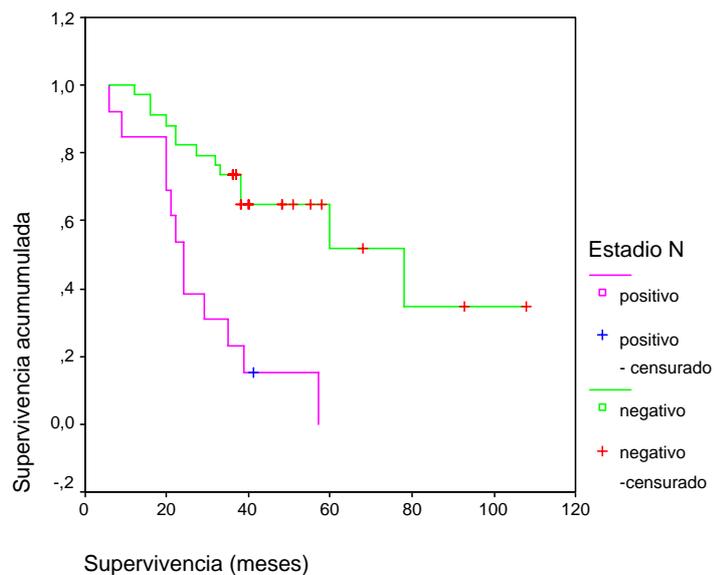


Figura 121: Función de supervivencia y estadio N

IV.10.A.e. Estadio Clínico

Los tiempos medios de supervivencia fueron de 75,61 meses (54,34-96,80), 71,97 meses (52,11-91,82), 35,94 meses (24,14-47,75), y 24,09 meses (17,09-31,09), para los tumores en estadios I, II, III y IV, respectivamente. La media de supervivencia de los pacientes disminuyó significativamente a medida que el estadio clínico de la lesión avanzaba ($p=0,0005$; Log Rank Test).

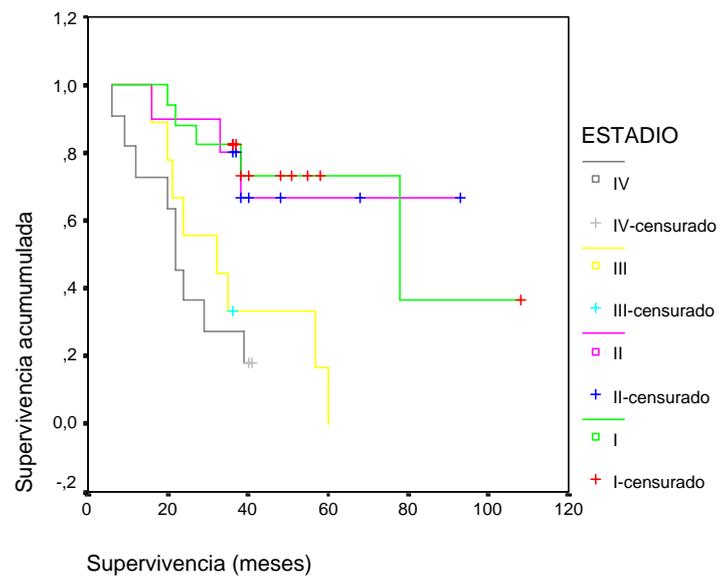


Figura 122: Función de supervivencia y estadio clínico

IV.10.A.f. Tratamiento del tumor primario

El tiempo medio de supervivencia para los pacientes en que la cirugía fue la única modalidad de tratamiento del tumor primario fue de 57,28 meses (42,60-71,97), y de 44,43 meses (24,97-63,90) para los pacientes que recibieron tratamiento combinado de cirugía + radioterapia. Esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0,2374$; Log Rank Test).

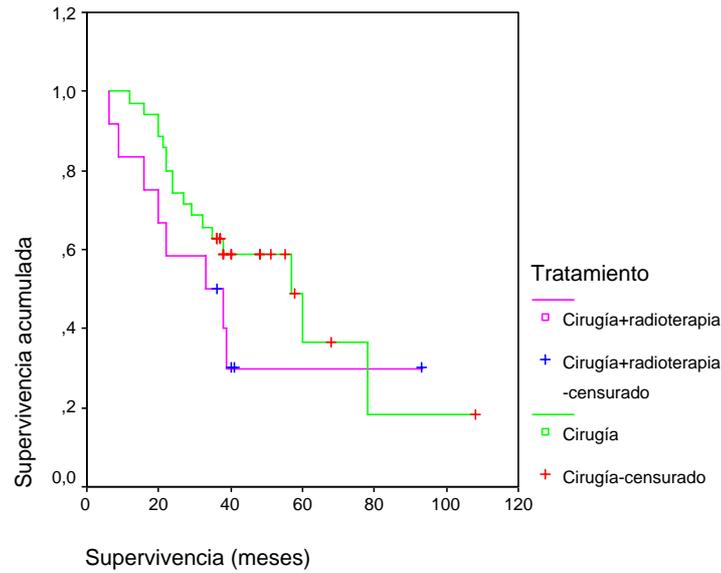


Figura 123: Función de supervivencia y tratamiento del tumor primario

IV.10.B. Parámetros Histológicos

IV.10.B.a. Grado de diferenciación histológica

Los pacientes con tumores bien diferenciados presentaron un tiempo medio de supervivencia de 51,67 meses (42,25-61,10), y de 46,31 meses (32-09-60,52) para los tumores moderadamente diferenciados. Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p=0,0281$, Log Rank Test).

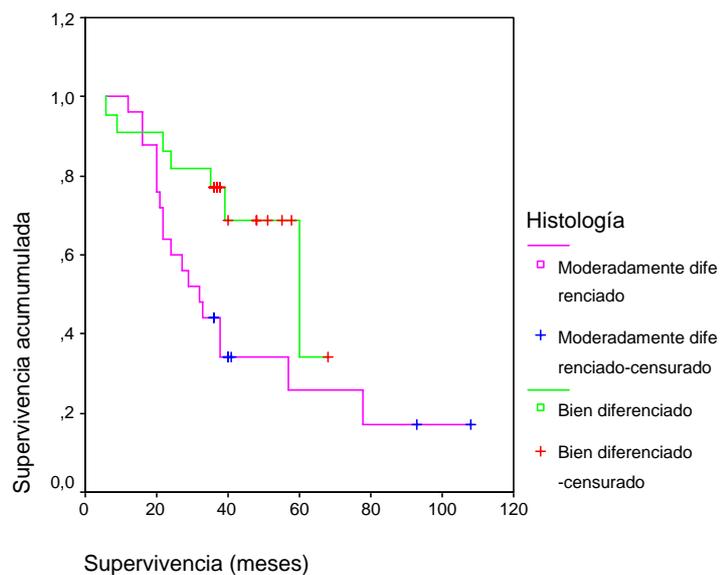


Figura 124: Función de supervivencia y grado de diferenciación histológica

IV.9.10.b. Modo de Invasión Tumoral

El tiempo medio de supervivencia en pacientes con tumores poco invasivos (A y B) fue de 61,65 meses (43,73-79,57) y de 46,84 meses (34,79-59,19) para los pacientes con tumores muy invasivos (C y D). Esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0,324$; Log Rank Test).

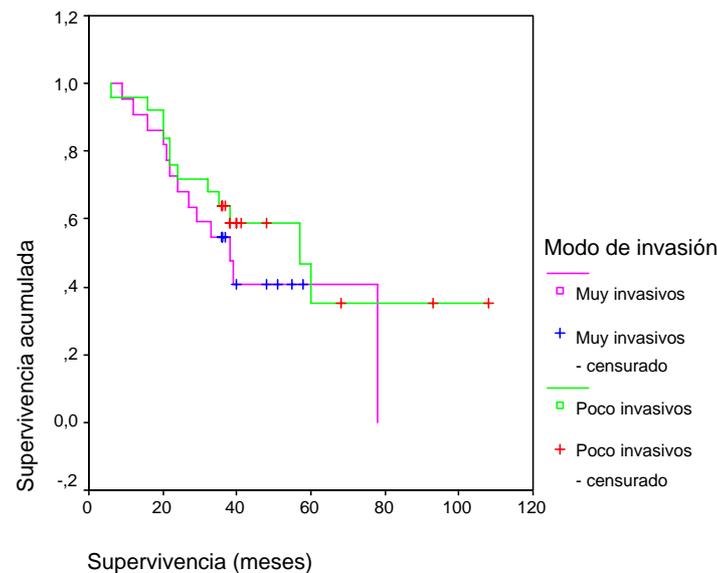


Figura 125: Función de supervivencia y modo de invasión tumoral

IV.10.B.c. Profundidad de invasión tumoral

Al considerar la profundidad tumoral como una variable continua no se ha encontrado influencia de esta variable en la supervivencia de los paciente ($\text{Exp}(\beta)=1,113$, $p=0,109$; Regresión de Cox). Para investigar el papel del grosor tumoral en el pronóstico hemos aplicado diversos valores de corte y analizado cada uno de estos valores mediante el método de Kaplan Meier. Los pacientes con tumores < 8 mm presentaron una media de supervivencia significativamente más alta (67,86 meses, 50,92-84,80) en relación a los pacientes con lesiones ≥ 8 mm (35,78 meses, 21,33-0,22) ($p=0,029$, Log Rank Test).

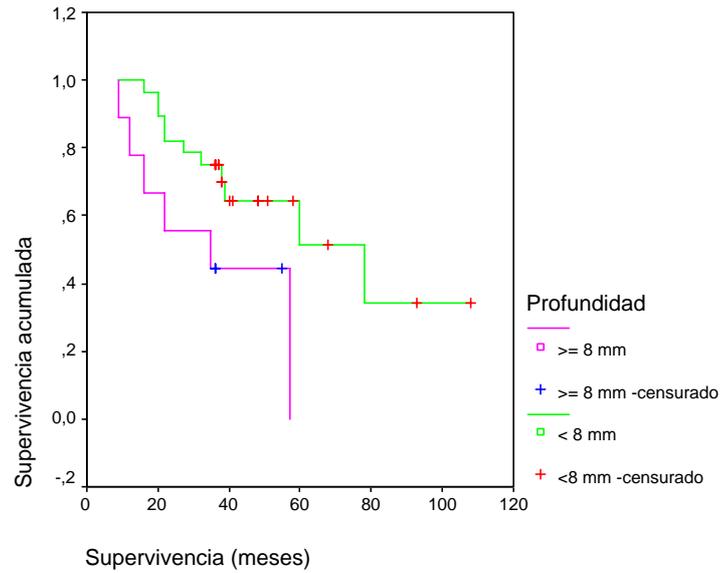


Figura 126: Función de supervivencia y profundidad de invasión

IV.10.B.d. Invasión perineural

El tiempo medio de supervivencia para los pacientes con tumores con invasión perineural fue de 36,48 meses (43,02-70,90) y para los pacientes con tumores sin invasión perineural fue de 56,96 meses (23,59-49,37). Esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0,517$; Log Rank Test).

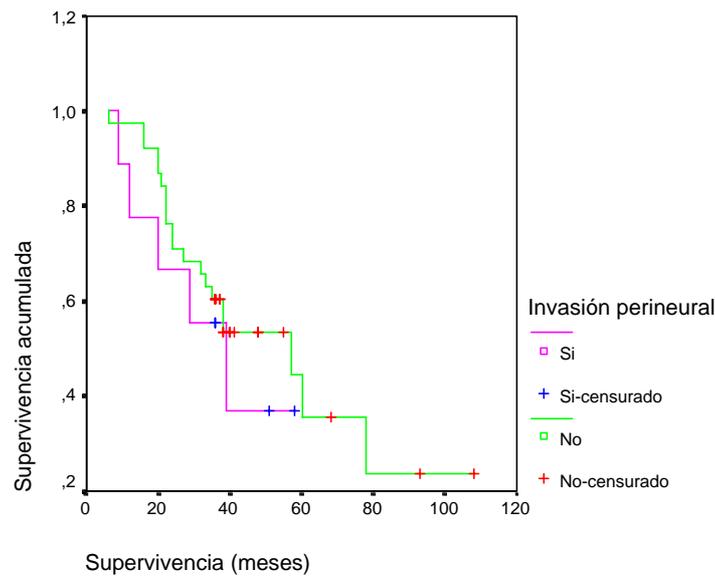


Figura 127: Función de supervivencia e invasión perineural

IV.10.B.e. Estado de los márgenes quirúrgicos

El tiempo medio de supervivencia fue de 58,10 meses (44,25-71,96) para los pacientes con tumores con márgenes quirúrgicos negativos y de 27 meses (15,06-38,94) para los pacientes con tumores con márgenes quirúrgicos positivos. Esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0,1004$; Log Rank Test).

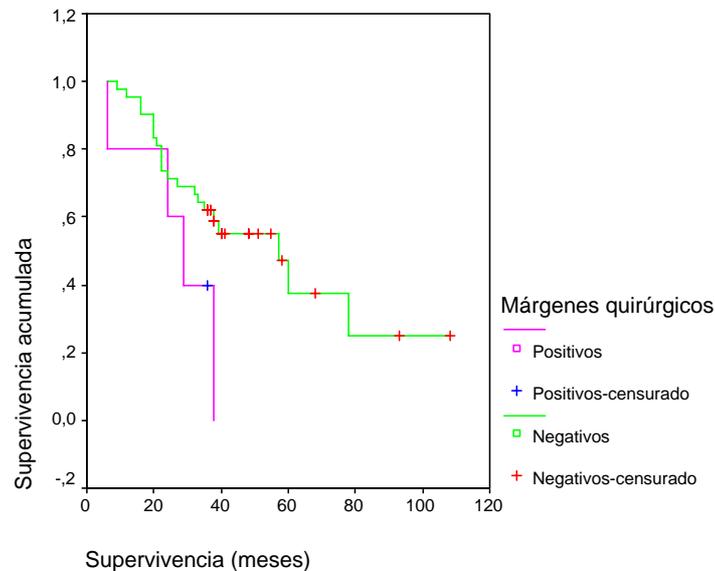


Figura 128: Función de supervivencia y estado de los márgenes quirúrgicos

IV.10.C. Parámetros inmunohistoquímicos

IV.10.C.a. Índice de proliferación celular (MIB-1)

No se encontró una relación estadísticamente significativa entre el índice de proliferación y la supervivencia de los pacientes ($\text{Exp}(\beta)=1,021$, $p=0,114$; Regresión de Cox).

IV.10.C.b. Expresión de EGFR

El tiempo medio de supervivencia para los pacientes con expresión negativa/débil de EGFR fue de 63,31 meses (42,86-83,76), mientras para los pacientes con expresión moderada/intensa fue de 49,72 meses (36,31-63,13). Esta diferencia no fue significativa estadísticamente ($p=0,33$; Log rank Test).

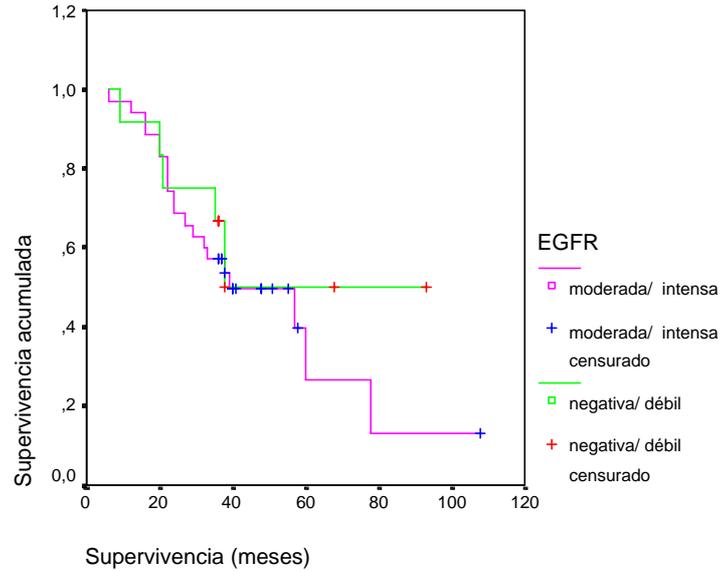


Figura 129: Función de supervivencia y expresión de EGFR

IV.10.C.c. Expresión de laminina 5 γ 2

Los pacientes con tumores con expresión negativa/débil de laminina 5 γ 2 presentaron un tiempo medio de supervivencia de 51,77 meses (39,02-64,52), mientras el tiempo medio de supervivencia para los pacientes con tumores con expresión moderada/intensa fue de 65,24 meses (47,68-82,81). Esta diferencia no fue significativa ($p=0,871$; Log rank Test).

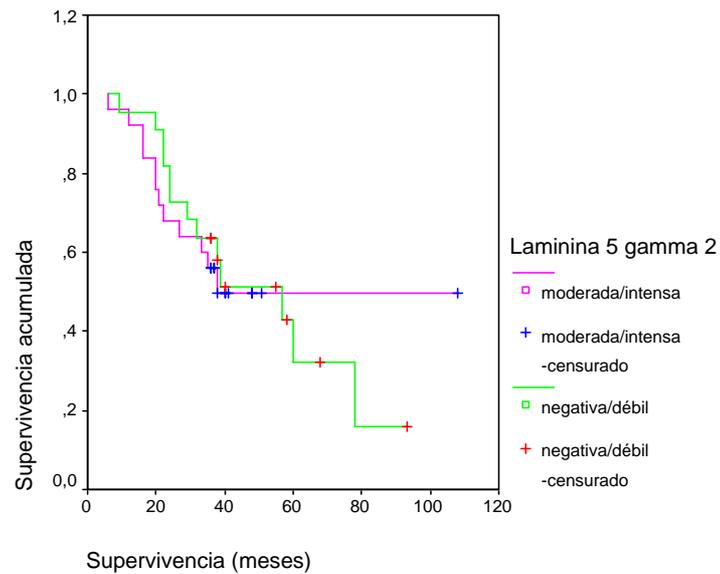


Figura 130: Función de supervivencia y expresión de laminina 5 γ 2

IV.10.C.d. Expresión de cadherina-E

El tiempo medio de supervivencia de los pacientes con tumores con expresión negativa/débil de cadherina-E (33,33 meses ; 20,24-46,43) fue significativamente más bajo que el de los pacientes con expresión moderada/intensa de cadherina-E (65,71 meses; 35,78-84,22) ($p=0,0013$; Log Rank Test).

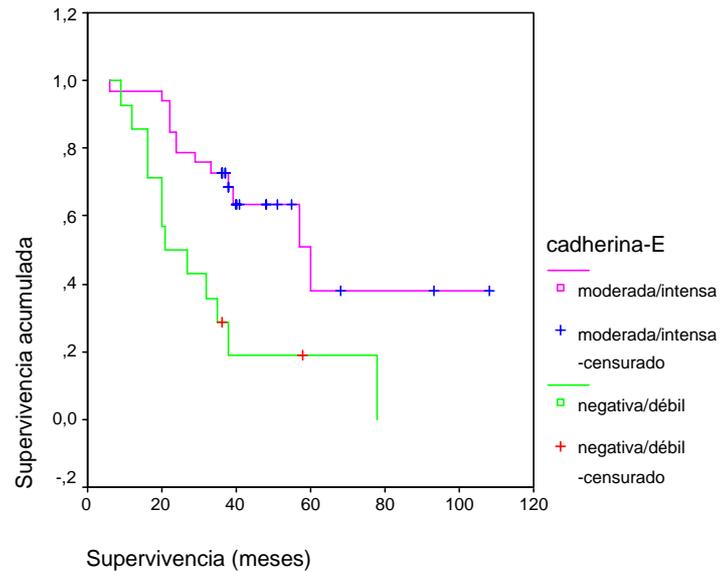


Figura 131: Función de supervivencia y expresión de cadherina-E

Variable	N	Media	Intervalo de confianza de 95%		p
Rango de edad					
≤ 45 años	9	37,33	25,06	65,12	0,1445
> 45 años	38	56,19	42,32	10,05	
Sexo					
- Hombre	39	51,90	38,62	65,12	0,5676
- Mujer	8	50,63	41,91	59,34	
Localización					
- Lengua	18	42,17	33,73	50,61	0,8771
- Suelo de boca	13	50,46	32,98	67,94	
- Reborde alveolar	9	40,46	27,60	53,51	
- Trígono retromolar	3	32,67	23,69	41,64	
- Paladar duro	3	78,67	31,72	125,61	
- Mucosa yugal	1	38,00	-	-	
Tamaño del tumor primario (estadio T)					
- T1	18	73,19	52,58	93,80	0,0092
- T2	12	63,64	43,80	83,48	
- T3	7	36,64	21,15	52,12	
- T4	10	25,60	18,55	32,65	
Ganglios linfáticos cervicales (estadio N)					
- N0	34	67,82	51,56	84,08	0,0004
- N1	8	27,00	16,82	37,18	
- N2	5	26,20	15,57	36,83	
Estadio clínico					
- Estadio I	17	75,61	54,34	96,89	0,0005
- Estadio II	10	71,97	52,11	91,82	
- Estadio III	9	35,94	24,14	47,75	
- Estadio IV	11	24,09	17,09	31,09	
Tratamiento del tumor primario					
- Cirugía	35	57,28	42,60	71,37	0,2374
- Cirugía + Radioterapia	12	44,43	24,97	63,90	
Grado de diferenciación histológica					
- Bien diferenciado	22	51,67	42,25	61,10	0,0281
- Moderadamente diferenciado	25	46,31	32,09	60,52	
Modo de invasión tumoral					
- Poco invasivo	25	61,65	43,73	79,57	0,3249
- Muy invasivo	22	46,84	34,49	59,19	
Estado márgenes quirúrgicos					
- Márgenes negativos	42	58,10	44,25	71,96	0,2374
- Márgenes positivos	5	27,00	15,06	38,94	
Invasión perineural					
- Sin invasión	38	56,96	43,02	70,90	0,5172
- Con invasión	9	36,48	23,59	49,37	

Variable	N	Media	Intervalo de confianza de 95%		p
Expresión EGFR					
- Negativa/débil	12	59,92	37,77	82,06	0,4800
- Moderada/intensa	35	50,44	36,93	63,95	
Expresión laminina 5 γ2					
- negativa/débil	22	51,77	39,02	64,52	0,8712
- Moderada/intensa	25	65,24	47,68	82,81	
Expresión cadherina-E					
- Negativa/débil	14	33,33	20,24	64,52	0,0013
- Moderada/intensa	33	65,71	48,38	82,81	

Tabla 18. Tiempo medio de supervivencia, intervalo de confianza y valor de significación (p) para las distintas variables categóricas según el método de Kaplan Meier

Variable	N	Exp (β)	Intervalo de Confianza del 95%		p
Edad	47	0,994	0,965	1,024	0,682
Profundidad de invasión tumoral	37	1,113	0,976	1,270	0,109
Índice de proliferación (MIB-1)	46	1,021	0,995	1,047	0,114

Tabla 19: Valores de asociación entre las variables cuantitativas continuas y la supervivencia mediante regresión de Cox.

IV.10.D. Análisis multivariante de la supervivencia

El análisis multivariante mediante el modelo de riesgo proporcional de Cox, incluyendo el tamaño tumoral, estadio N, estadio clínico, diferenciación histológica, profundidad ≥ 8 mm, expresión de cadherina-E, demostró que solamente el estadio clínico y la expresión negativa/débil de cadherina-E son valores pronósticos independientes de la supervivencia.

Variable	Exp (β)	Sig	IC 95% exp (β)	
			Inferior	Superior
Estadio I/Estadio II	1,678	0,497	0,377	7,475
Estadio II/Estadio III	5,221	0,007	1,574	3,360
Estadio III/ Estadio IV	12,639	0,000	3,360	47,540
Expresión de cadherina-E (moderada/intensa)/(negativa/débil)	5,436	0,000	2,142	13,799

Tabla 20: Resultados del análisis multivariante mediante el modelo de riesgo proporcional de Cox.

V. DISCUSIÓN

V.1. CONSIDERACIONES SOBRE LA MUESTRA DE PACIENTES ESTUDIADA

Aunque los carcinomas de células escamosas localizados en la región de cabeza y cuello presenten características clínico-patológicas similares, la biología tumoral y las estrategias terapéuticas muestran cambios significativos de una localización a otra. Muchos de los estudios mezclan grupos con carcinomas de diversas localizaciones de cabeza y cuello con modalidades de tratamiento muy variadas, y aunque en principio las muestras estudiadas parezcan amplias, suelen dividirse en pequeños grupos cuando se separan estas lesiones por localización anatómica. Como consecuencia, las diferencias en los estudios a la hora de agrupar las distintas localizaciones bajo el término de “cáncer oral” ha generado gran confusión en la literatura.

Agrupar los CCE de distintas localizaciones tiene como ventaja aumentar el número de la muestra, además de evitar la necesidad de la definición exacta de la localización primaria, lo que eliminaría el problema a la hora de asignar una localización específica para tumores primarios que se extienden a distintas localizaciones anatómicas.²⁴⁹

La mayor desventaja que presenta agrupar lesiones de distintas localizaciones, las cuales pueden presentar características epidemiológicas y biológicas distintas, es la pérdida de información respecto al comportamiento de lesiones asentadas en localizaciones específicas.²⁵⁰ Por ejemplo, combinar el cáncer de labio con el cáncer intraoral en una categoría más amplia definida como cáncer oral podría enmascarar los datos en relación al cáncer intraoral.²⁵¹

Se han realizado diversos intentos de definición del cáncer oral, sin embargo parece no haber consenso en la literatura. Teniendo en cuenta esta falta de consenso entre los autores, la comparación entre distintos estudios debe ser considerada con precaución.

Con el objetivo de estudiar una muestra más homogénea, el presente estudio se limitó a las localizaciones intraorales: porción móvil de la lengua, suelo de boca, reborde alveolar superior e inferior, mucosa yugal, paladar duro y trigono retromolar.

Al analizar la supervivencia del cáncer oral, es de obvia importancia asegurarse de que todos los pacientes fueron examinados durante un tiempo de seguimiento mínimo, dentro del cual suelen ocurrir la mayoría de las muertes asociadas a esta enfermedad. Whitehurst y Droulias²⁵² han descrito que el 85% de las recidivas del cáncer de lengua ocurren en el primer año, 95% en los 2 primeros años y el 100% el 3 años. A su vez, Decroix y Ghossein²⁵³ han descrito que la mayoría de las muertes asociadas a la enfermedad en los pacientes con cáncer de lengua ocurren en los 3 primeros años post-tratamiento. Por lo tanto, la tasa de supervivencia a los 3 años para los pacientes con CCEO parece ser adecuada para la valoración de la supervivencia en estos pacientes. Las tasas de supervivencia y de tiempo libre de enfermedad a los 3 años, 59% y 37%, fueron similares a las descritas en otros estudios.²⁵⁴

El grupo de pacientes analizado mostró una media de edad similar a las descritas en otros estudios. La proporción entre hombres y mujeres también se aproxima a las descritas en la mayoría de los estudios.²⁵⁵ Aunque estudios recientes indiquen un incremento en la incidencia del CCEO en mujeres, nuestros resultados no confirman esta situación. Izarzugasa et al.²⁵⁶ en un estudio sobre los aspectos epidemiológicos del cáncer oral y orofaríngeo en el País Vasco también encontraron una incidencia más alta en los hombres, comprobando que ésta no varió durante el intervalo estudiado (1986-1994).

V.2. CONSIDERACIONES SOBRE LOS PARÁMETROS CLÍNICOS

El pronóstico de los pacientes con CCEO es determinado directamente por la extensión y en particular la diseminación del tumor a los ganglios linfáticos cervicales. Sin embargo, en pacientes geriátricos el pronóstico también se ve influenciado por los factores relacionados a la edad, debido principalmente a que estos pacientes con frecuencia presentan sus funciones pulmonares, cardiovasculares, renales y endocrinas comprometidas. Por eso, frecuentemente el plan de tratamiento en pacientes mayores está limitado por la edad avanzada. En algunos casos la terapia estándar puede no ser bien tolerada por los pacientes, por lo que son excluidos de regímenes de tratamiento más agresivos con una posible disminución de la supervivencia de estos pacientes.²⁵⁷

Sin embargo, la influencia de la edad en el pronóstico de los pacientes con cáncer oral no está clara. Nuestros resultados concuerdan con los de varios otros estudios que no encuentran diferencias entre la supervivencia de los pacientes en relación a la edad.^{258, 259} Sin embargo, Varela-Centelles et al.²⁶⁰ han encontrado que la edad y el tamaño de la lesión fueron los principales factores pronósticos en una muestra de 94 pacientes con CCEO.

La presentación de un CCEO en pacientes jóvenes es rara, aunque esta incidencia parece estar aumentando.²⁶¹ En la literatura, el grupo de pacientes jóvenes fue definido arbitrariamente como pacientes menores de 30, 40 y 45 años.^{262, 263, 264} Para algunos autores los pacientes jóvenes presentan tumores más agresivos con tasas de recidivas, metástasis cervicales y mortalidad más elevadas.²⁶⁵ Sin embargo, otros estudios²⁶⁶ no corroboran estos hallazgos. Para estos autores la percepción de una enfermedad más agresiva en los pacientes jóvenes puede estar influenciada por aspectos emocionales personales debido a la aparición de una enfermedad mortal en pacientes jóvenes, ya que la baja incidencia de cáncer oral en este grupo de pacientes es insuficiente para confirmar esta hipótesis científicamente.

Recientemente, Sasaki et al.²⁶⁷ estudiaron las características clínico-patológicas del CCEO en pacientes < 40 años; sin embargo, no encontraron características clínico-patológicas específicas en este grupo de pacientes. Tampoco encontraron diferencias entre la supervivencia de los pacientes < 40 y \geq 40 años. Para los dos grupos de pacientes los factores pronósticos más importantes fueron el estadio clínico y el modo de invasión tumoral.

El sistema TNM es aceptado mundialmente como un sistema de clasificación para el cáncer. Este sistema valora la extensión anatómica de los tumores sólidos malignos, la cual es uno de los indicadores más importantes para el tratamiento y un importante factor de predicción del pronóstico.

El estadio T, estadio N y estadio clínico se correlacionaron con la supervivencia de los pacientes en el análisis univariante mediante las curvas de Kaplan Meier; sin embargo, en el análisis multivariante el estadio T y N perdieron significación estadística como factores pronósticos independientes y solamente el estadio clínico se

correlacionó con la supervivencia. Estos resultados indican que la combinación del tamaño del tumor y la afectación de los ganglios cervicales en grupos más amplios proporcionan un mejor acercamiento al pronóstico de los pacientes con cáncer oral.

Las metástasis cervicales en el cáncer oral son relativamente frecuentes. Al igual que en el presente estudio, se ha descrito una reducción significativa de las tasas de supervivencia de los pacientes con metástasis linfáticas cervicales en comparación con los pacientes sin metástasis.²⁶⁸ Se ha enfatizado también que éste sería el principal indicador pronóstico de los pacientes con cáncer oral.²⁶⁹

Parece ser que la diseminación metastásica a los ganglios linfáticos cervicales se correlaciona directamente con el tamaño del tumor primario. Se ha demostrado que tumores T1 de lengua y suelo de boca presentan metástasis cervicales en el 14% y el 11%, respectivamente, mientras los tumores T4 las presentan en el 76,5% y el 53,5%, respectivamente.²⁷⁰ En nuestro estudio el tamaño del tumor primario también se correlacionó con la presencia de adenopatías cervicales palpables, y con mayor incidencia de recidivas regionales. Sin embargo, las metástasis cervicales pueden desarrollarse a partir de tumores relativamente pequeños (n=12, T1/T2), mientras tumores de gran tamaño pueden evolucionar sin diseminación metastásica cervical (n=7, T3/T4).

Desde de la creación del sistema TNM, se han realizado diversas revisiones. En relación con el cáncer oral, recientemente se han propuesto algunas modificaciones en la 5ª edición de la clasificación TNM de la AJCC.²⁷¹ Adicionalmente, el grupo alemán-austriaco-suizo para el estudio de tumores en la región maxilofacial (DÖSAK) ha demostrado, en un extenso estudio retrospectivo sobre 1532 casos de cánceres orales primarios, que la modificación en la clasificación TNM, incluyendo el grosor del tumor, aumentó significativamente la separación y distribución de los estadios clínicos con respecto a las tasas de supervivencia a los 5 años.⁶⁵ Sin embargo, el grosor del tumor aún no ha sido incluido en el sistema TNM,²⁷¹ aunque se ha demostrado que este parámetro tiene valor pronóstico en los pacientes con cáncer oral en diversos estudios.^{272, 273}

Se ha descrito que el consumo de tabaco y alcohol, además de un factor de riesgo reconocido, también se asocia a un pronóstico desfavorable en pacientes con CCEO.³⁹ Sin embargo, otros autores no encontraron asociación entre el consumo de tabaco y alcohol y el pronóstico en pacientes con CCEO.²⁷⁴

La ausencia de datos en relación con el consumo de tabaco y alcohol en la serie estudiada (aproximadamente 50% de los casos) no permitió relacionar la presencia de estos hábitos y los demás parámetros estudiados.

La modalidad de tratamiento del tumor primario no presentó relación significativa con las recidivas locales, recidivas regionales y la supervivencia de los pacientes. Sin embargo, el intervalo libre de enfermedad fue más corto en los pacientes que recibieron tratamiento combinado con cirugía + radioterapia, aunque esta asociación no fue estadísticamente significativa. El 66% de los pacientes que recibieron esta modalidad de tratamiento presentaban tumores en estadios clínicos avanzados (estadios III y IV), lo que podría explicar el menor intervalo libre de enfermedad encontrado en este grupo de pacientes.

La fuerte influencia del estadio clínico en el pronóstico enfatiza la importancia del diagnóstico y tratamiento precoz del CCEO.

V.3. CONSIDERACIONES SOBRE LOS PARÁMETROS HISTOLÓGICOS

V.3.A. Grado de diferenciación histológica

El sistema TNM incluye factores pronósticos importantes, pero no pueden predecir con exactitud las propiedades biológicas de los tumores. Por ejemplo, este sistema no explica la proporción considerable de tumores pequeños con un pronóstico más desfavorable de lo esperado.²⁷⁵

El grado de diferenciación celular ha sido considerado como un factor predictivo importante de la diseminación tumoral a los ganglios linfáticos cervicales.²⁷⁶ En nuestro estudio la diferenciación histológica no se correlacionó con la presencia de adenopatías cervicales palpables y con la incidencia de recidivas regionales. Sin embargo, los

tumores menos diferenciados se correlacionaron con una mayor incidencia de recidivas locales y un menor intervalo libre de enfermedad. Además, los tumores bien diferenciados presentaron un pronóstico más favorable en comparación con los tumores moderadamente diferenciados.

V.3.B. Modo de invasión Tumoral

La gradación histológica de los tumores para predecir el pronóstico de los pacientes con CCEO ha sido utilizada por décadas. El valor pronóstico de los diferentes sistemas utilizados ha variado considerablemente.²⁷⁷ Los patólogos han observado que las células tumorales en las zonas más invasivas de los tumores malignos difieren sustancialmente de las células de las zonas centrales y de la superficie. Teniendo en cuenta estos hallazgos, se han desarrollado diversos sistemas de clasificación histológica basados en la valoración cualitativa de parámetros histológicos como el grado de queratinización, polimorfismo nuclear y celular, número de mitosis, profundidad de invasión, modo de invasión e infiltrado linfocitario. Algunos estudios han enfocado el modo de invasión como el parámetro histológico más significativo a la hora de predecir la supervivencia de los pacientes.^{278, 279}

Los tumores con un patrón histológico más invasivo suelen asociarse con la aparición de recidivas locales,²⁸⁰ posiblemente por la mayor dificultad de conseguir unos márgenes quirúrgicos libres de infiltración neoplásica.

Spiro et al.³² estudiaron el papel del modo de invasión en el CCE de lengua. Encontraron asociación entre el modo de invasión y la edad y estadios T, N y M. El modo de invasión no se asoció con la diferenciación histológica del tumor. La supervivencia de los pacientes con tumores con patrón más invasivo fue significativamente más baja en comparación con pacientes con tumores menos invasivos.

Bundgaard et al.²⁷⁹ estudiaron 8 parámetros histológicos en 78 CCEO en estadio I, y encontraron que el modo de invasión fue el único criterio con valor pronóstico en este grupo de pacientes. Los autores concluyen que la valoración del modo de invasión

representa una alternativa simple en comparación a otros métodos más complejos en los cuales se mezclan varios parámetros histológicos.

En el presente estudio, el modo de invasión no presentó relación directa con la supervivencia de los pacientes. Sin embargo, mostró una fuerte asociación con la aparición de recidivas locales. Además, se asoció con la reducción de la expresión de cadherina-E, un marcador predictivo de un pronóstico desfavorable.

Estos datos sugieren que el modo de invasión tumoral sea otro criterio a considerar a la hora de decidir por el tratamiento coadyuvante con radio y/o quimioterapia post-operatoria.

V.3.C. Profundidad de invasión tumoral

Muchos autores han observado que el grosor del tumor se correlaciona mejor con el desarrollo de metástasis a los ganglios linfáticos cervicales y la supervivencia do que el diámetro superficial. Sin embargo, la medición del grosor de los tumores varía considerablemente en los diversos estudios . Aunque la mayoría de los autores utilizaron un micrómetro óptico,^{281, 282, 283, 284} otros no especifican como obtuvieron las medidas.^{285, 286} Algunos autores^{283, 284} midieron el grosor del tumor como la distancia a partir del punto de invasión más profundo hasta la superficie de los tumores, mientras que en otros estudios^{241, 282, 286} los autores definieron el grosor tumoral como la distancia desde el punto de invasión más profundo hasta una línea imaginaria que reconstruía la membrana basal de la mucosa normal adyacente. Además, en algunos estudios^{241, 283, 284} los autores ignoraron la capa de queratina e infiltrado inflamatorio presentes en las lesiones mientras otros no providenciaron datos a respecto.²⁸⁵

Asumiendo que el tejido normal presenta mayor resistencia al crecimiento en profundidad que al crecimiento lateral,²⁸¹ cabe esperar que cuanto más capacidad de crecimiento en profundidad, más agresivo será el tumor. Así, para González-Moles et al.,²⁴¹ la masa tumoral que revela la capacidad de crecimiento en profundidad del tumor, y por lo tanto, su agresividad, es aquélla que se observa por debajo de una línea imaginaria que reconstruye la membrana basal de la mucosa oral normal, ya que representa la capacidad de destrucción del tejido tumoral por parte de las células

neoplásicas. Según estos autores, el crecimiento exofítico del tumor no debe ser considerado, porque no representa la capacidad real de invadir los tejidos, venciendo su resistencia a la invasión tumoral. Basándose en el mismo criterio, estos autores creen que el espacio dejado por debajo de la membrana basal en lesiones ulceradas debe ser considerado, ya que representa la capacidad destructiva de la lesión. Nosotros estamos de acuerdo con este punto de vista, motivo por el cual adoptamos como criterio de profundidad la distancia entre el punto de invasión más profundo hasta una línea imaginaria que reconstruye la membrana basal de la mucosa normal.

Otro tema de controversia en relación a la importancia del grosor tumoral en el pronóstico del CCEO es el grosor (valor de corte) que separa los tumores con un peor pronóstico. Spiro et al.²⁸² encontraron un pronóstico más pobre para las lesiones con más de 2 mm. Brown et al.²⁸³ encontraron un peor pronóstico para las lesiones con más de 3 mm, y González-Moles et al.²⁴¹ también observaron que los pacientes con lesiones de hasta de 3 mm presentaban una tasa de supervivencia más alta que los paciente con lesiones de mayor grosor. Además, no encontraron diferencias en las tasas de supervivencia de los pacientes con lesiones de entre 4 y 7 mm y aquéllos con lesiones de más de 7 mm. Urist et.²⁸⁷ definieron que el valor de corte para separar los tumores con peor pronóstico es de 6 mm.

En el presente estudio no hemos encontrado relación entre la profundidad de invasión o grosor del tumor y ninguna de las variables clínico-patológicas e inmunohistoquímicas estudiadas. Además, cuando se analizó la profundidad de invasión como una variable numérica continua, no se demostró asociación con el pronóstico. De todas formas, para profundizar en el análisis, hemos testado varios valores de corte con el intento de agrupar los tumores con comportamientos clínicos distintos. Así, pacientes con tumores ≥ 8 mm de grosor presentaron un pronóstico significativamente peor en comparación con los pacientes con tumores < 8 mm.

Algunos estudios, trataron de relacionar el grosor del tumor con las recidivas locales y el desarrollo de metástasis cervicales.^{282, 283, 286} Estudio recientes demuestran que la profundidad del tumor es un factor pronóstico significativo en el CCE de lengua, probablemente por el acceso al sistema linfático lo que facilita la diseminación

regional.²⁸⁸ Nosotros no hemos encontrado asociación entre el grosor del tumor y la presencia de adenopatías palpables o diseminación metastásica del tumor.

V3.D. Invasión perineural

La invasión perineural es una vía de diseminación reconocida en tumores de diversos tipos histológicos en la región de cabeza y cuello. En la literatura, la prevalencia de invasión perineural en carcinomas de cabeza y cuello aparece entre un 6 y un 30%,^{289, 290} similar al 19% encontrado en este estudio.

No se encontró asociación entre la invasión perineural, y recidivas locales y regionales, intervalo libre de enfermedad y supervivencia en este grupo de pacientes.

Rahima et al.²⁹⁰ encontraron una asociación entre la invasión perineural y las recidivas regionales, metástasis a distancia, y menor tasa de supervivencia a los 5 años.

La invasión perineural se correlaciona con otros parámetros histológicos, como el grado de diferenciación histológica²⁹⁰ y la profundidad de invasión,²⁹¹ lo que sugiere que los tumores con invasión perineural son biológicamente más agresivos.

V.3.E. Márgenes quirúrgicos

Para algunos autores, uno de los factores pronósticos individuales más importantes es la extirpación quirúrgica completa de la lesión, siendo el fracaso en la erradicación del tumor primario la principal causa de muerte en estos pacientes.²⁹² Si las células neoplásicas están presentes en el margen de resección, la tasa de recidiva local aumenta sustancialmente y la tasa de supervivencia disminuye.²⁹³

En esta serie de pacientes, no se pudo confirmar la relación directa entre el estado de los bordes quirúrgicos y la incidencia de recidivas locales y regionales. Sin embargo, la presencia de infiltración neoplásica en los márgenes se asoció a un intervalo libre de enfermedad significativamente más corto, tanto en el análisis univariante como en el análisis multivariante.

No hay acuerdo en la literatura sobre el papel del tratamiento coadyuvante con radio y quimioterapia postoperatoria en la mejoría del pronóstico de los pacientes con márgenes quirúrgicos positivos en la resección quirúrgica. Kovács²⁹⁴ encontró que el tratamiento postoperatorio con radio y/o quimioterapia no mejoró las tasas de supervivencia de los pacientes con márgenes quirúrgicos con infiltración microscópica del tumor. Sin embargo, Zelefsky et al.²⁹⁵ sí han descrito buenos resultados en el control postoperatorio con radioterapia en tumores con márgenes quirúrgicos positivos. Aunque la radioterapia disminuye el riesgo de recidiva, no reduce a tasas similares a las vistas en pacientes con márgenes libres de tumor.²⁹²

Un problema potencial de muchos estudios que han investigado la relación entre el estado de los márgenes quirúrgicos y el pronóstico es el uso del análisis univariante. La recidiva tumoral ocurre debido a la interrelación de múltiples factores.²⁹⁶ Algunos estudios que utilizaron el análisis multivariante no han demostrado una relación independiente entre el estado de los márgenes quirúrgicos con recidivas locales y la supervivencia.^{296, 297}

Por otro lado, la identificación de los márgenes quirúrgicos positivos para infiltración neoplásica mediante histología parece ser insuficiente, y se ha descrito un sistema de estadiaje molecular basado en alteraciones genéticas para detectar células neoplásicas. La detección de mutaciones en el gen *P53* mediante PCR, permitió la identificación de células neoplásicas en 13/25 de los pacientes con márgenes quirúrgicos negativos histológicamente. En 5 de estos pacientes hubo recidiva local en comparación con ninguna recidiva en los 12 pacientes con márgenes negativos para mutaciones del gen *P53*.²⁹⁸ En otro estudio similar, se detectaron mutaciones del gen *P53* en el 72% de los tumores con bordes quirúrgicos considerados como negativos en el examen histológico.²⁹⁹ La presencia de alteraciones genéticas en el epitelio histológicamente normal adyacente al tumor podría explicar la falta de relación entre el estado de los bordes quirúrgicos y la supervivencia encontradas en éste y otros estudios.

V.4. CONSIDERACIONES SOBRE LOS PARÁMETROS INMUNOHISTOQUÍMICOS

En las últimas décadas se han estudiado diversos marcadores con posible asociación con el pronóstico de pacientes con cáncer oral. Desafortunadamente, la

mayoría de los marcadores patológicos, biológicos y moleculares no ha sido lo suficientemente investigada.³⁰⁰ Las principales razones de esta situación son la falta del adecuado número de pacientes incluidos en el estudio, diferentes procedimientos en cada laboratorio y la no utilización de tratamientos estandarizados.

V.4.A. Índice de proliferación celular (MIB-1)

El estudio de la expresión del antígeno Ki-67/MIB-1 mediante inmunohistoquímica ha sido ampliamente utilizado para la valoración del número de células en proliferación en diversos tipos de tumores. Sin embargo, la cuantificación de la proliferación celular mediante la determinación del MIB-1 difiere metodológicamente de unos estudios a otros, recomendándose la cuantificación de las células positivas en tantos por ciento o la utilización del recuento por milímetros cuadrados (mm²) y en el caso de lesiones displásicas por milímetros de longitud de la capa basal.^{157, 301, 302}

Un método de cuantificación altamente efectivo y reproducible, aplicado con éxito en el cáncer de mama y vejiga se describe a continuación. En cada campo, un punto de una rejilla óptica es usado para registrar los núcleos celulares MIB-1 +/- (lo que permite una medición completamente aleatoria de los núcleos dentro del área seleccionada). Deben ser medidos por lo menos 150 núcleos por caso. Así, el punto de la rejilla puede ser MIB-1 positivo, negativo, o puede no contener ningún núcleo. El porcentaje de MIB-1 se define como [(MIB-1 positivo)/ MIB-1 positivo + MIB-1 negativo] x 100. Este método da resultados mucho más reproducibles que los procedimientos convencionales de contaje de núcleos positivos y negativos.

Otro tema de debate se refiere al área del tumor a cuantificar, ya que se reconoce que la expresión de MIB-1 presenta un patrón heterogéneo dentro del mismo tumor. En este sentido, se ha descrito que la proliferación celular es más alta en el frente de invasión tumoral, en comparación con zonas más centrales y superficiales del tumor.^{152, 306} Se ha reconocido también que en el frente de invasión las células tumorales presentan un comportamiento biológico más agresivo y una mejor información a respecto a la progresión y pronóstico de los pacientes.²⁸ Hemos elegido este área para hacer la cuantificación del índice de proliferación celular.

Aunque la determinación del índice MIB-1 demuestre la capacidad proliferativa de las células tumorales, existe controversia respecto a la aplicabilidad clínica de este marcador en el CCEO. En el presente estudio, el índice de proliferación, valorado como una variable numérica continua, no se correlacionó con ninguno de las variables clínico, patológicas e inmunohistoquímicas estudiadas, con excepción de un índice significativamente más alto en las mujeres que en los hombres. Tampoco se encontró relación con el tiempo libre de enfermedad y la supervivencia. Además, hemos analizado el valor de este marcador, transformándolo en una variable categórica utilizando varios puntos de corte, y tampoco se encontró relación entre el MIB-1 y las variables citadas anteriormente.

Desconocemos el significado de la obtención de un índice de proliferación más alto en pacientes del sexo masculino. Pocos estudios han correlacionado estas dos variables en el CCEO. Tumuluri et al.³⁰³ han encontrado un índice de proliferación de los CCEO 6% más alto en las mujeres que en los hombres, aunque esta diferencia no fue significativa. Por otra parte, de Vicente et al.³⁰⁴ no han encontrado una correlación entre el índice de proliferación de los tumores y el sexo de los pacientes.

Bortoluzzi et al.³⁰⁵ encontraron una disminución en el índice de proliferación según las lesiones de CCEO avanzaban hacia un menor grado de diferenciación.

Sittel et al.¹⁶⁵ no encontraron relación con el grado de diferenciación histológica. Sin embargo, la proliferación fue más alta en los tumores con recidiva en comparación con los tumores sin recidivas. Además, los tumores con índice de proliferación por encima de la media presentaron un tiempo libre de enfermedad significativamente más corto. Todos los pacientes fueron tratados con cirugía + radioterapia, por lo que los autores concluyen que el índice de proliferación mediante el Ki-67/MIB-1 es un buen indicador de recidivas tempranas en los pacientes tratados con este régimen terapéutico.

de Vicente et al.³⁰³ encontraron relación entre la proliferación y la diferenciación histológica, a menor grado de diferenciación, mayor proliferación. Sin embargo, los autores no encontraron relación entre la proliferación celular y la supervivencia.

Xin Xie et al.¹⁶³ no encontraron relación entre el índice Ki-67 y el tamaño, estadio N, estadio clínico, y diferenciación histológica de los tumores. Sin embargo, encontraron una asociación entre la expresión de Ki-67 y el intervalo libre de enfermedad, que fue menor para los tumores con una proliferación más alta.

Tumuluri et al.³⁰³ analizaron la proliferación celular mediante Ki-67 en el frente de invasión tumoral de los CCEO. Los autores determinaron el índice de proliferación celular cuantificando el número de células positivas por mm² del epitelio mediante un sistema de análisis automático de imagen diseñado específicamente para el estudio. Encontraron una proliferación más alta en el frente de invasión de tumores mayores de 5 mm y en tumores en estadios avanzados (estadio III y IV). Además, los tumores con estadio N2 presentaron un índice de proliferación más que los tumores N0 y N1. Hecho interesante fue que la proliferación fue significativamente más alta en tumores N0 en comparación con tumores N1. Este hecho, que al principio puede parecer contradictorio, es explicado por los autores debido a la posibilidad de que ganglios linfáticos positivos no sean detectados mediante palpación en los pacientes con estadio N0. Por último, los autores encontraron una proliferación más alta en los tumores con metástasis a distancia.

Otros estudios,³⁰⁶ no han encontrado relación entre la afectación de los ganglios linfáticos cervicales, supervivencia y la proliferación celular en el frente de invasión tumoral.

Silva et al.²⁵⁴ encontraron una relación entre la expresión de Ki-67 y la supervivencia de los pacientes; aquellos pacientes con tumores con índices de proliferación más altos presentaron una supervivencia significativamente más corta.

Bettendorf y Herrmann³⁰⁷ estudiaron la expresión de Ki-67 en 329 CCEO. El índice de proliferación se correlacionó con el grado de diferenciación histológica, el patrón de invasión, el tamaño y profundidad de invasión del tumor, el estado de los ganglios linfáticos cervicales, y la tasa de supervivencia a los 5 años. El índice de proliferación, valorado individualmente, no mostró asociación con el pronóstico.

Stoll et al.³⁰⁸ no encontraron relación entre la expresión de MIB-1 y el tiempo libre de enfermedad y la supervivencia en un grupo de 107 CCE de cavidad oral y orofaringe.

Como resultado de la revisión de la literatura, se podría concluir que, aunque el índice de proliferación celular (MIB-1) se correlacione con el grado de diferenciación celular, este parece no ser un buen indicador pronóstico en la mayoría de los estudios. El crecimiento de la población celular de un tumor depende de por lo menos tres factores: el porcentaje de células que se encuentran dentro del ciclo celular, la duración del ciclo celular, y la tasa de la pérdida celular. Por lo cual, para algunos autores, parece imposible comprender la biología del crecimiento tumoral utilizando solamente un marcador,³⁰⁹ lo que podría explicar en parte los resultados contradictorios descritos en la literatura.

V.4.B. Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)

Estudios acerca de la prevalencia de inmunoreactividad para EGFR en los CCEO han obtenido resultados contradictorios. Sakai et al.³¹⁰ han descrito la expresión de EGFR en el 14,8% de los casos de CCEO. Kusakawa et al.³¹¹ detectaron la expresión de EGFR en el 30,8% de los casos. Otros estudios,³¹² han detectado la expresión de EGFR en todos los CCE de cabeza y cuello estudiados incluyendo los CCEO.³¹⁶

Algunos estudios han correlacionado la expresión de EGFR con el estadio tumoral avanzado y la presencia de metástasis linfáticas cervicales,³¹¹ mientras otros estudios no confirman estas correlaciones y concluyen que el estudio de la expresión de EGFR no añade información al estudio clínico-patológico de pacientes con cáncer oral.¹¹³

La proliferación celular y el desarrollo del cáncer están relacionados con los factores de crecimiento y sus receptores. Así, era de esperar que a mayor expresión de EGFR encontraríamos una mayor tasa de proliferación celular; sin embargo, no encontramos diferencias en la proliferación celular entre los distintos niveles de expresión de EGFR. Nuestros resultados coinciden con los de Kręćicki et al.,³¹³ que no

encontraron diferencias en la proliferación celular entre CCE de laringe EGFR positivos y negativos.

El significado pronóstico de los niveles de expresión de EGFR en el CCEO también es motivo de controversias. Mientras algunos autores han encontrado que niveles más altos de expresión de EGFR se correlacionan significativamente con un pronóstico menos favorable, otros autores han descrito una correlación inversa.³¹⁴ Otros estudios no han encontrado correlación entre la expresión de EGFR y la supervivencia de los pacientes.

Maiorano et al.³¹⁴ han valorado la expresión de EGFR en el citoplasma y en la membrana de las células neoplásicas y han encontrado expresión positiva en el 36% de los casos. Además, los pacientes con tumores con expresión positiva de EGFR en membrana y/o citoplasma presentaron un pronóstico más favorable. Cuando la expresión de EGFR fue observada únicamente en la membrana, la correlación con un mejor pronóstico fue más significativa.

Ulanovski et al.³¹⁸ encontraron expresión de EGFR en el 34% de los 23 CCE de lengua estudiados. Encontraron una asociación entre la diferenciación histológica y la expresión de EGFR en 23 casos de CCE de lengua; tumores menos diferenciados presentaron una mayor intensidad de expresión de EGFR. No encontraron correlación entre la expresión de EGFR y el grosor del tumor o el estadio N, dos factores importantes en la progresión tumoral. Tampoco encontraron asociación entre la expresión de EGFR y la presencia de metástasis cervicales, profundidad del tumor, recidivas y supervivencia.

Bankfalvi et al.³¹⁵ han observado una correlación entre la expresión de EGFR y el modo de invasión tumoral en 75 casos de CCEO. Además, han encontrado una correlación entre EGFR y el estadio T. La sobreexpresión de EGFR se correlacionó con un pronóstico desfavorable en este grupo de pacientes.

Störkel et al.³¹⁶ estudiaron el valor pronóstico de la expresión de EGFR en 100 pacientes con CCEO. Todos los casos presentaron expresión de EGFR; además, la expresión de EGFR se correlacionó con los grados de estadiaje en el frente de invasión

tumoral. La intensidad y cantidad de la expresión de EGFR se correlacionó fuertemente con la supervivencia de los pacientes a los 5 años.

Partridge et al.¹⁰¹ fueron unos de los primeros investigadores en estudiar la expresión de EGFR en el CCEO. Estudiaron una muestra de 20 casos y no encontraron correlación entre la expresión de EGFR y el grado de diferenciación celular, tiempo libre de enfermedad y supervivencia. Posteriormente, Bergler et al.,¹¹² tampoco encontraron correlación entre la expresión de EGFR y el estadio tumoral.

Yamada et al.³¹⁷ encontraron expresión positiva en el 51% de los CCEO estudiados. Esta expresión no se correlacionó con el grado de diferenciación celular.

Xia et al.⁹⁶ estudiaron el valor predictivo del EGFR (HER-1), HER-2, HER-3 y HER-4 en 47 casos de CCEO y encontraron una relación significativa entre los 4 marcadores y la supervivencia. Sin embargo, estos autores observaron que la combinación de los 3 primeros miembros de la familia obtuvieron unos valores de predicción mas altos que cualquiera de los marcadores analizados individualmente.

Un estudio reciente, sobre 23 pacientes con CCE de lengua, Ulanovsky et al.³¹⁸ no encontraron relación entre la expresión de EGFR y las tasas de recidiva y de supervivencia. En este estudio los autores encontraron una relación entre la expresión de EGFR y la diferenciación tumoral. En este mismo estudio, los autores no encontraron relación entre la expresión de EGFR y la profundidad de la lesión tumoral.

Aunque la mayoría de los estudios sugieren una implicación pronóstica de la sobreexpresión de EGFR en el CCE de cabeza y cuello, algunos estudios son contradictorios. Esas discrepancias pueden deberse a factores como la técnica empleada (sensibilidad y especificidad, tiempo de fijación de los tejidos, diferentes pretratamientos y anticuerpos), número reducido de pacientes en algunos estudios, variación en la localización, estadio y tratamiento de las lesiones, tiempo de seguimiento corto, y métodos estadísticos.

El papel crítico de la expresión de EGFR en la carcinogénesis ha llevado a la investigación de inhibidores selectivos de esta vía de señalización. Entre las estrategias

más importantes que se encuentran en desarrollo clínico, la inmunoterapia mediante anticuerpos monoclonales y la quimioterapia dirigida mediante moléculas inhibidoras de la actividad tirosina-quinasa han sido las más investigadas.

El uso óptimo de este tipo de terapia exige la determinación cuantitativa del EGFR en cada tumor, ya que la sobreexpresión es el único criterio de selección para el tratamiento con estos agentes específicamente dirigidos. Con este objetivo, diversos estudios han utilizado la determinación semi-cuantitativa de EGFR mediante inmunohistoquímica en pacientes con CCE de cabeza y cuello y CCEO.

Al no existir una guía diagnóstica aceptada para la valoración de la expresión de EGFR, en el presente estudio se utilizó una escala semicuantitativa dividida de 4 grados, los cuales se agruparon en expresión negativa/débil y expresión moderada/intensa. Desde el punto de vista predictivo, el 98,2% de los pacientes presentaron expresión positiva del EGFR y se podría considerar que la sobreexpresión fue observada en el 74,4% de los casos (expresión moderada/severa),

Schartinger et al.³¹⁹ utilizando el kit EGFRpharmadiagnostic™ (DakoCytomation), detectaron la expresión de EGFR en 70,5% de las muestras de CCE oral y orofaríngeo. Utilizando una escala de valoración similar a la utilizada en el presente estudio, los autores encontraron sobreexpresión de la proteína en el 42,6%. Aunque, al igual que los resultados aquí presentados, los autores no encontraron una relación entre la expresión de EGFR y la supervivencia, éstos concluyen que debido a la alta frecuencia de expresión de EGFR en este tipo de cáncer, estos pacientes podrían ser susceptibles de tratamiento dirigido contra el EGFR.

Debido a los datos contradictorios en relación a la frecuencia de sobreexpresión de EGFR en el CCEO, existe una necesidad de la estandarización de una escala de valoración inmunohistoquímica validada con finalidad diagnóstica.

IV.4.C. Laminina 5 γ 2

Una de las moléculas de adhesión celular relacionada con el proceso de invasión y metástasis tumoral es la laminina 5 γ 2.

En la muestra estudiada, la tinción inmunohistoquímica para el marcador laminina 5 γ 2 ha revelado patrones característicos. Las células tumorales presentaron positividad, mientras que las células del tejido normal y del estroma fueron negativas. Solamente 4 muestras de CCEO fueron totalmente negativas.

El patrón de tinción ha demostrado una correlación significativa con el porcentaje de células positivas. Por lo tanto, hemos caracterizado el tumor según su patrón de expresión de laminina 5 γ 2, una vez que algunos autores consideran el patrón de tinción representa la biología tumoral más precisamente que el número de células positivas.²¹⁶

En el presente estudio, no se encontró asociación entre el patrón de expresión de laminina 5 γ 2 y ninguna de las variables estudiadas. Tampoco se encontró asociación entre el patrón de laminina 5 γ 2 y la expresión de EGFR. Además, al analizar las curvas de supervivencia mediante el método de Kaplan Meier, no se encontró asociación entre la expresión de laminina 5 γ 2 y el pronóstico de los pacientes.

Hasta la fecha existen pocos estudios que hayan investigado la expresión de laminina 5 γ 2 en el CCEO, y la mayoría se restringieron al CCE de lengua.

Ono et al.²¹⁶ fueron los primeros en investigar la expresión de laminina 5 γ 2 en el cáncer oral. En su estudio sobre 67 CCE de lengua, los autores no encontraron relación entre la expresión de laminina 5 γ 2 y el estadio tumoral, metástasis cervicales y profundidad de invasión. Sí encontraron relación entre la expresión de laminina 5 γ 2 y la diferenciación histológica y modo de invasión tumoral. A medida que la expresión de laminina 5 γ 2 aumentó, el tumor presentó una diferenciación histológica más pobre y un patrón más invasivo. Además, los autores encontraron que el pronóstico de los pacientes fue menos favorable a medida que los niveles de expresión de laminina 5 γ 2 fueron más altos.

En un estudio posterior,²¹⁷ sobre 108 CCE de lengua, estos mismos autores confirmaron sus hallazgos iniciales. En este estudio, la profundidad de invasión, que en el estudio anterior había presentado una tendencia a asociarse con la expresión de laminina 5 γ 2, aumentó a medida que los niveles de expresión de laminina 5 γ 2

umentaron. Además, los autores investigaron la posible relación entre la expresión de EGFR y laminina 5 γ 2, observando que los tumores con expresión alta de EGFR también presentaban una alta expresión de laminina 5 γ 2. Nuevamente, el aumento de la expresión de laminina 5 γ 2 se correlacionó con un pronóstico menos favorable.

Stoltfuz et al.²¹⁸ estudiaron la expresión de laminina 5 γ 2 en 36 tumores T1 de lengua. No encontraron relación con el grado de diferenciación histológica; sin embargo, el aumento de la expresión de laminina 5 γ 2 se correlacionó con un aumento del riesgo de recidivas.

Por otro lado, Lim et al.³²⁰ no encontraron asociación entre la expresión de laminina 5 γ 2 y la existencia de metástasis cervicales y el pronóstico en CCE de lengua en estadios iniciales (estadios I y II).

V.4. D. Expresión de cadherina-E

La expresión de cadherina-E no se correlacionó con el estadio T y el grado de diferenciación histológica. Sin embargo, sí se encontró una correlación entre el modo de invasión tumoral y la expresión de cadherina-E. Así, los tumores con un patrón histológico más invasivo, o sea, con una mayor disociación de las células neoplásicas, presentaron expresión ausente/débil de cadherina-E con más frecuencia que los tumores menos invasivos. Tanaka et al.³²¹ también encontraron relación entre la pérdida de expresión de cadherina-E y el modo de invasión tumoral.

Bánkfalvi et al.³²² estudiaron el papel de distintas moléculas involucradas en la adhesión celular en el epitelio (CD44, cadherina-E, β -catenina) durante la evolución de la carcinogénesis oral. Los autores concluyen que en los estadios precoces de la carcinogénesis puede haber un aumento transitorio en la expresión de cadherina-E, que finalmente revierte con la pérdida de expresión cuando las células tumorales adquieren un fenotipo invasivo (estadio tardío de la carcinogénesis).

Bagutti et al.³²³ encontraron correlación entre la expresión de cadherina-E y la diferenciación histológica; los tumores menos diferenciados presentaron una expresión reducida de cadherina-E.

Shinohara et al.³²⁴ no encontraron correlación con la diferenciación histológica del tumor. Sin embargo, encontraron que la pérdida de expresión de cadherina-E se correlacionó con patrones histológicos más invasivos. Además, encontraron una disminución de la expresión de cadherina-E en tumores con metástasis linfática cervical.

La cadherina-E es una molécula de adhesión intercelular que juega un papel importante en el mantenimiento de las conexiones intercelulares. Cambios o alteraciones en la expresión de la E-cadherina han sido postulados como un evento precoz en el proceso de metástasis tumoral.³²⁵ En el presente estudio no hemos encontrado asociación entre la expresión de cadherina-E y la presencia de metástasis cervicales en el momento del diagnóstico. Sin embargo, hemos encontrado una fuerte asociación entre la reducción en la expresión de cadherina-E y las recidivas regionales y a un intervalo libre de enfermedad significativamente más corto.

Estos resultados difieren de los de Tanaka et al.³²¹ que estudiaron la expresión de cadherina-E en el proceso de metástasis linfáticas en 159 pacientes con CCEO. Estos autores encontraron una relación significativa entre la reducción en la expresión de cadherina-E en los tumores primarios y la existencia de metástasis cervicales en el momento del diagnóstico.

En el presente estudio, la presencia de metástasis regionales en el momento del diagnóstico se valoró mediante inspección clínica, sin el auxilio de técnicas de diagnóstico de imagen complementarias. La sensibilidad de la palpación para detección de metástasis cervicales es de aproximadamente 70%.³²⁶ Es posible que los pacientes con reducción de la expresión de cadherina-E presentasen metástasis cervicales subclínicas en el momento del diagnóstico, lo que explicaría la asociación entre esta disminución de expresión y la mayor incidencia de recidivas regionales y el intervalo libre de enfermedad más corto.

Chow et al.²³⁰ han investigado la expresión de cadherina-E en 85 casos de CCE de lengua. Encontraron una reducción en la expresión en el 85% de los casos. Esta no se correlacionó con el sexo, edad, diferenciación histológica o estadio clínico. Sin embargo, la reducción de la expresión de cadherina-E se correlacionó con la presencia

de metástasis linfáticas cervicales clínicas y subclínicas. Además, las recidivas locales y regionales fueron significativamente más frecuentes en los tumores con expresión ausente o débil.

Chang et al.³³¹ encontraron expresión reducida de cadherina-E en el 83% de los casos estudiados. El pronóstico en este grupo de pacientes fue significativamente más pobre en comparación con los pacientes con fuerte expresión de cadherina-E.

Tanaka et al.³²¹ encontraron una reducción en la supervivencia de los pacientes con expresión reducida de cadherina-E. Encontraron una asociación entre la reducción en la expresión de cadherina-E y las metástasis linfáticas cervicales.

Lim et al.³²⁰ estudiaron el valor de distintos marcadores histológicos e inmunohistoquímicos (p53, Ki-67, EGFR, Ciclina D1, CD31, Cox-2, MUC1, laminina 5 γ 2, cadherina E, y catenina- β) para predecir la aparición de metástasis linfáticas cervicales tardías en tumores estadios I y II. En el análisis multivariante, la expresión de cadherina-E fue el único marcador inmunohistoquímico asociado con la aparición de metástasis cervicales.

En el presente estudio, el análisis univariante mostró que la expresión ausente/débil de cadherina-E fue un marcador indicativo de un pronóstico desfavorable. Esta asociación se confirmó en el análisis multivariante.

Aún no se comprende totalmente el mecanismo de adhesión intercelular mediado por la cadherina-E. Se han sugerido distintas causas para la pérdida de expresión de cadherina-E. Entre ellas, la supresión del gen promotor, desestabilización de la proteína a través de la pérdida de la unión con las cateninas, o mutaciones y deleciones en el gen *cadherina-E*.³²³ La pérdida de heterocigosidad en el cromosoma 16, donde se localiza el gen *cadherina-E*, es frecuente en el carcinoma hepatocelular,³²⁷ carcinoma de esófago³²⁸ y mama.³²⁹ En los CCE de cabeza y cuello la pérdida de heterocigosidad en el cromosoma 16 es infrecuente y las translocaciones aparecen en una minoría. En el CCEO el gen de *cadherina-E* no sufre mutaciones.³³⁰

Una de las líneas más aceptadas en la inactivación de la función de la cadherina-E es el silenciamiento transcripcional por hipermetilación de islas CpG en la región promotora del gen de cadherina-E.³³¹ Nakayama et al.³³² encontraron que el 94,4% de los casos con pérdida en la expresión de cadherina-E presentaban hipermetilación de las islas CpG en la región promotora del gen. Estos mismos hallazgos fueron confirmados cuando los autores estudiaron la metilación en líneas celulares de CCEO con ausencia de expresión de cadherina-E. Además, cuando se aplicó un agente desmetilante a estos cultivos celulares, las células recuperaron la expresión de cadherina-E y presentaron un patrón de crecimiento más cohesivo.

Uno de los posibles mecanismos por el cual la metilación del ADN puede regular la expresión genética es la prevención de la unión de factores de transcripción a las regiones promotoras metiladas. Las evidencias actuales sugieren que la unión de factores de transcripción esenciales para la expresión de cadherina-E es inhibida por la metilación de la región promotora.³²⁹

Nuestros resultados sugieren que la disminución de la expresión de cadherina-E es un importante marcador de la disociación de las células neoplásicas. Este potencial más invasivo conlleva a un mayor riesgo de recidivas locales y regionales resultando en un peor pronóstico de los pacientes con CCEO.

El pobre pronóstico asociado con la expresión reducida de cadherina-E puede ser utilizado como un marcador útil, conjuntamente con otros marcadores clínicopatológicos, en la decisión terapéutica en el manejo del CCEO.

VI. CONCLUSIONES

1. El carcinoma oral de células escamosas se presenta preferentemente en hombres, con una edad media de 58,06 años, se localiza principalmente en la lengua, se diagnostica en estadios avanzados en el 42,5% de los casos, y tiene una supervivencia media de 55,35 meses.
2. Los tumores de mayor tamaño, mayor grado N y estadio clínico más avanzado presentaron un tiempo libre de enfermedad significativamente más corto y un peor pronóstico.
3. Los tumores menos diferenciados y con un modo de invasión más infiltrante mostraron una mayor incidencia de recidivas locales. Los tumores menos diferenciados y con márgenes quirúrgicos positivos presentaron un intervalo libre de enfermedad significativamente más corto. Los tumores menos diferenciados y con profundidad de invasión ≥ 8 mm presentaron un pronóstico más desfavorable.
4. El índice de proliferación celular medio de los tumores fue de 57,28%, y no se correlacionó con ninguno de los parámetros clínicos, histológicos o inmunohistoquímicos estudiados, con excepción de un índice significativamente más alto en los hombres en comparación con las mujeres. Tampoco mostró relación con las recidivas, el intervalo libre de enfermedad y la supervivencia.
5. La expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico y de laminina 5 $\gamma 2$ no se correlacionó con ninguno de los parámetros clínicos, histológicos o inmunohistoquímicos estudiados, ni tampoco con las recidivas, intervalo libre de enfermedad y supervivencia.
6. La expresión negativa/débil de cadherina-E se correlacionó con un modo de invasión más infiltrante, una mayor incidencia de recidivas regionales, un intervalo libre de enfermedad significativamente más corto y un pronóstico desfavorable.

7. El análisis multivariante del intervalo libre de enfermedad demostró que el estadio más avanzado, la infiltración neoplásica de los márgenes quirúrgicos y la expresión negativa/débil de cadherina-E fueron los únicos parámetros indicativos de un menor intervalo libre de enfermedad.

8. El análisis multivariante de la supervivencia demostró que el estadio clínico más avanzado y la expresión negativa/débil de cadherina-E fueron los únicos parámetros indicativos de un peor pronóstico en esta serie de pacientes con carcinoma oral de células escamosas.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-
- ¹ Stewart BW, Kleihues P, eds. World cancer report: IARC press: Lyon, 2003.
- ² Sudbo J, Bryne M, Lotan R, Reith A, Kildal W, Davidson B, Soland TM, Lippman SM. Molecular based treatment of oral cancer. *Oral Oncol* 2003; 39: 749-58.
- ³ Serra Majen L, Ramón Torrel JM. Cáncer oral: Epidemiología y prevención. En: Cuenca Sala E, Manau Navarro C, Serra Majen L, eds. *Odontología preventiva y comunitaria*. Barcelona: Masson; 2003. p. 173-93.
- ⁴ Nieto A, Ramos AR. Rising trends in oral cancer mortality in Spain, 1975-94. *J Oral Pathol Med* 2002; 31: 147-52.
- ⁵ Diz Dios P, Padrón González N, Seone Lestón J, Tomas Carmona I, Limeres Posse J, Varela-Centelles P. "Scheduling delay" in oral cancer diagnosis: a new protagonist. *Oral Oncol* 2005; 41: 142-6.
- ⁶ Moreno Lopez LA, Esparza Gomez GC. Oral cancer versus head and neck cancer. *Oral Oncol* 1998; 34: 576-7.
- ⁷ Moore SR, Pierce AM, Wilson DF. "Oral cancer" – The terminology dilemma. *Oral Dis* 2000; 6: 191-3.
- ⁸ McCartan B. "Oral cancer"- The terminology dilemma". *Oral Dis* 2001; 7: 66.
- ⁹ Wood NK, Sawyer DR. Cáncer Oral. En: Wood NK, Goaz PW. *Diagnósticos diferenciales de las lesiones orales y maxilofaciales*. Madrid: Harcourt Brace de España SA; 1998. p. 587-95.
- ¹⁰ Macfarlane GJ, Boyle P, Evstifeeva TV, Robertson C, Scully C. Rising trends of oral cancer world-wide: the result of an old public health problem. *Cancer Causes Control* 1994; 5: 259-65.
- ¹¹ Mignona MD, Fedele S, Lo Russo L. The world cancer report and the burden of oral cancer. *Eur J Cancer Prev* 2004; 13: 139-42.
- ¹² Parkin SM, Laara E, Muir CS. Estimates of the worldwide frequency of sixteen major cancers. *Int J of Cancer* 1988; 41: 184-97.

- ¹³ Nair UJ, Friesen M, Richard I, MacClennan R, Thomas S, Bartsch H. Effect of lime composition on the formation of reactive oxygen species from areca nut extract in vitro. *Carcinogenesis* 1990; 170: 170-1.
- ¹⁴ Sugerman PB, Savage NW. Current concepts in oral cancer. *Aust Dent J* 1999; 44: 147-56
- ¹⁵ Wingo PA, Ries LA, Rosenberg HM, Miller DS, Edwards BK. Cancer incidence and mortality, 1973-1985: a report card for the U.S. *Cancer* 1998; 82: 1197-207.
- ¹⁶ Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. Cancer statistics 2001. *CA Cancer J Clin* 2001; 51: 16-36.
- ¹⁷ Instituto Nacional do Cancer; Ministerio da Saude. Incidencia de Cancer no Brasil: Estimativa 2005.. Rio de Janeiro: INCA, 2004.
- ¹⁸ Junquera Gutiérrez LM, Albertos Castro JM. Precáncer y Cáncer Oral. En: López Arranz JS, Vicente Rodríguez JC, Junquera Gutiérrez LM. *Patología Quirúrgica Maxilofacial*. Madrid: Editorial Síntesis 1998; p. 262-78
- ¹⁹ Barasch A, Gota A, Krutchkoff DJ, Eisenberg E: Squamous cell carcinoma of the gingiva: a case analysis. *Oral Surg* 1995; 80: 183- 7.
- ²⁰ Sol Silverman Jr. Demographics and occurrence of oral and pharyngeal cancers. The outcomes, the trends, the challenge. *JADA* 2001; 132 (supl): 7- 11.
- ²¹ Burzynski NJ, Flynn MB, Faller NM, Ragsdale TL. Squamous cells carcinoma of the upper aerodigestive tract in patients 40 years of age and younger. *Oral Surg* 1992; 74: 404-8.
- ²² Hindle I, Nally F. Oral cancer: a comparative study between 1962-67 and 1980-84 in England and Wales. *Br Dent J* 1991; 170: 15-9.
- ²³ Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JM. *Oral and Maxillofacial Pathology*. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2002. p. 295-303.

- ²⁴ Haya-Fernandez MC, Bagan J, Murillo-Cortes J, Poveda-Roda R, Calabuig C. The prevalence of oral leukoplakia in 138 patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral Dis* 2004; 10: 346-8.
- ²⁵ García-García A, Ceballos-Salobreña, Gándara-Rey JM. Cáncer Oral. En: Ceballos-Salobreña A, Bullón-Fernández P, Gándara-Rey JMM, Chimenos-Küstner E, Blanco-Carrión A, Martínez-Sahuquillo A, García García A. *Medicina Bucal Práctica*. Santiago de Compostela: Editorial Danú SL; 2000. p.335- 68.
- ²⁶ Pindborg JJ, Reichart PA, Smith CJ, van der Waal I. *Histological typing of cancer and precancer of the oral mucosa*. Berlin: Springer-Verlag; 1997.
- ²⁷ Saap JP, Eversole LR, Wysocki GP. *Patología oral y maxilofacial contemporanea*. 2^a ed. Madrid: Mosby; 2005. p. 194.
- ²⁸ Bryne M, Koppang HS, Lilleng R; Kjaerhein A. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. *J Pathol* 1992; 166: 375-81.
- ²⁹ Anneroth G, Hanse LS, Silverman Jr S. Malignancy grading in oral squamous cell carcinoma. I. Squamous cell carcinoma of the tongue and the floor of the mouth: histologic grading and clinical evaluation. *J Oral Pathol Med* 1986; 15: 162-8.
- ³⁰ Bàngfalvi A, Piffkò J. Prognostic and predictive factors in oral cancer: the role of invasive tumour front. *J Oral Pathol Med* 2000; 29: 291-8.
- ³¹ Bryne M, Boysen M, Alfes CG, Abeler VM, Sudbo J, Nesland JM, et al. The invasive front of carcinomas. The important area of tumour prognosis? *Ancer Res* 1998; 18: 4747-64.
- ³² Spiro RH, Guillamondegui O Jr, Paulino AF, Huvos AG. Pattern of invasion and margin assessment in patients with oral tongue cancer. *Head Neck* 1999; 408-13.
- ³³ Regezi JA, Sciubba JJ. Lesiones ulcerativas. En: Regezi JA, Sciubba JJ. *Patología Bucal: Correlaciones clínicopatológicas*, 3^a ed. México: McGraw-Hill;2000. p. 31-85.

-
- ³⁴ Frazell EL, Lucas JC. Cancer of the tongue: report of the management of 1554 patients. *Cancer* 1962; 15: 1085-99.
- ³⁵ Raspal G. Cáncer de la cavidad oral y de orofaringe. En: Raspal G, ed. *Tumores de cara, boca, cabeza y cuello*. 2ª ed. Barcelona: Masson; 2000. p.47-52.
- ³⁶ Fleming ID, Cooper JS, Henson DE, Hunter RVP, Kennedy BJ, Murphy GP, et al., eds. *American Joint Committee on cancer (AJCC). AJCC Cancer staging manual*. 5th ed. J. B. Lippincott: Philadelphia, 1997. p.24-30.
- ³⁷ Sciuba JJ. Oral cancer and its detection. History-taking and the diagnostic phase of management. *JADA* 2001; 32 (Suppl): 12S- 18S.
- ³⁸ La Vecchia C, Tavani A, Franceschi S, Levi F, Corrao G, Negri E. Epidemiology and prevention of oral cancer. *Eur J Cancer Oral Oncol* 1997; 33B: 302-12.
- ³⁹ Bungard T, Bentzen SM, Wildt J. The prognostic effect of tobacco and alcohol consumption in intra-oral squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer Oral Oncol*, 1994; 30B: 323-8.
- ⁴⁰ Franco EL, Kowalski LP, Oliveira BV, Curado MP, Pereira RN, Silva ME, et al. Risk factors for oral cancer in Brazil: a case control study. *Int J Cancer* 1989; 43: 992-1000.
- ⁴¹ Sánchez MJ, Martínez C, Nieto A, Castellsague X, Quintana MJ, Bosch FX, et al. Oral and oropharyngeal cancer in Spain: influence of dietary patterns. *Eur J Cancer Prev* 2003; 12: 49- 56.
- ⁴² Sciuba JJ. Oral cancer. The importance of early diagnosis and treatment. *Am J Clin Dermatol* 2001; 2: 239-51.
- ⁴³ Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, et al. Evidence for causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 2000; 82: 709-20.
- ⁴⁴ Giovannelli L, Campisi G, Lama A, Giambalvo O, Osborn J, Margiotta V, et al. Human papillomavirus DNA in oral mucosal lesions. *J Infect Dis* 2002; 185: 833-6.

- ⁴⁵ Scully C, Cwson R. Potentially malignant oral lesions. *J Epidemiol Biostat* 1996; 1: 3-12.
- ⁴⁶ Scully C. Oncogenes, tumor supresor genes and viruses in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 1993; 22: 337-47.
- ⁴⁷ Renan MJ. How many mutations are required for tumor genesis? Implications from human cancer data. *Mol Carcinog* 1993; 7: 139-46.
- ⁴⁸ Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res* 1996; 56: 2488-92.
- ⁴⁹ Jonson NW, Warnakulasurya KAA. Oral Cancer: Is it more common than cervical? *Br Dental Res* 1991; 170: 170-171.
- ⁵⁰ Kligerman J. Estimativas sobre a incidencia e mortalidade por câncer no Brasil-2002. *Rev Bras Cancerologia* 2002; 48: 175-9.
- ⁵¹ Beeken SW, Krontiras H, Maddox WA, Peters GE, Soong S, Urist MM. T1 and T2 squamous cell carcinoma of the oral tongue: prognostic factors and the role of elective lymph node dissection. *Head Neck* 1999; 21: 124-30.
- ⁵² Silverman S Jr. *Oral cancer*. 4^a ed. Hamilton. Ontario: American Cancer Society, 1998.
- ⁵³ Jones AS, Morar P, Phillips DE, Field JK, Husband D, Helliwell TR. Second primary tumors in patients with head and neck cell carcinoma. *Cancer* 1995; 75: 1343-53.
- ⁵⁴ Silverman S, Greenspan D, Gorsky M. Tobacco usage in patients with head and neck carcinomas: a folow-up study on habit changes and second primary oral/pharyngeal cancers. *J Am Dent Assoc* 1983; 106: 33-5.
- ⁵⁵ Eckardt A. Clinical impact of synchronous and metachronous malignances in patients with oral cancer. *J Oral Maxillofac Surg* 1993; 22: 282-4.

- ⁵⁶ Khuri FR, Lippman SM, Spitz MR, Lotan R, Hong WK. Molecular epidemiology and retinoid chemoprevention of the head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 199-211.
- ⁵⁷ Slaughter DP, Southnick HW, Smeskal W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium. Clinical implications of multicentric origins. *Cancer* 1953; 6: 963-8.
- ⁵⁸ Incze J, Vaughan CW. Field cancerization in the aerodigestive tract: its etiology, manifestation and significance. *J Otolaryngol* 1984; 13: 1-6.
- ⁵⁹ Braakhuis BJ, Tabor MP, Leemans CR, van der Waal I, Snow GB, Brakenhoff RH. Second tumors and field cancerization in oral and oropharyngeal cancer: molecular techniques provide new insights and definitions. *Head Neck* 2002; 24: 198-206.
- ⁶⁰ Strong MS, Incze J, Vaughan CW. Field cancerization in the aerodigestive tract – its etiology, manifestation, and significance. *J Otolaryngol* 1984; 13: 1-6.
- ⁶¹ Ogden GR. Field cancerisation in the head and neck. *Oral Dis* 1998; 4: 1-3.
- ⁶² Kim ES, Hong WK, Khuri FR. Chemoprevention of aerodigestive tract cancers. *Annu Rev Med* 2002; 2: 23-43.
- ⁶³ Spencer KR, Ferguson JW, Weisenfeld D. Current concepts in the management of oral squamous cell carcinoma. *Aust Dent J* 2002; 47: 284-9.
- ⁶⁴ Day TA, Davis BK, Gillepsie MB, Joe JK, Kibbey M, Martin.Harris B, et al. Oral cancer treatment. *Curr Treat Options Oncol* 2003; 4 : 27-41.
- ⁶⁵ Howaldt HP, Kainz M, Euler B, Vorast H. Proposal for modification of the TNM staging classification for cancer of the oral cavity. *DÖSAK. J Craniomaxillofac Surg* 1999; 27: 275-88.
- ⁶⁶ Harris LB, Sessions RB, Hong WK. *Head and neck cancer: a multididisciplinary approach*. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1998.

- ⁶⁷ August M, Gianetti K. Elective neck irradiation versus observation of the clinically negative neck of patients with oral cancer. *J Oral Maxillofac Surg* 1996; 54: 1050-5.
- ⁶⁸ Shah JP, Andersen PE. Evolving role of modifications in neck dissection for oral squamous cell carcinoma. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1995; 33: 9-14.
- ⁶⁹ Werner JA, Davis RK. Principles of surgery. En: Werner JA, Davis RK , eds. *Metastases in head and neck cancers*. Berlin: Springer-Verlag; 2004. p. 111-34.
- ⁷⁰ Crile G. Excisión of cancer of the head and neck with special reference to the plan of dissection base on one hundred an thirty-two operations. *JAMA* 1906; 47: 1780-6.
- ⁷¹ Hancock PJ, Epstein JB, Sadler GR. Oral and dental management related to radiation therapy for head and neck cancer. *J Can Dent Assoc* 2003; 69: 585-90.
- ⁷² Goffinet DR, Fee WE, Goode RL. Combined surgery and postoperative irradiation in the treatment of cervical lymph nodes. *Arch Otolaryngol* 1984; 110: 736-8.
- ⁷³ Hill BT, Price LA. Lack of survival advantage in patients with advanced squamous cell carcinomas of the oral cavity receiving neoadjuvant chemotherapy prior to local therapy, despite achieving an initial high clinical complete remission rate. *Am J Clin Oncol* 1994; 17: 1-5.
- ⁷⁴ Lin JC, Jan JS, Hsu CY, Wong DY. High rate of clinical response to weekly outpatient neoadjuvant chemotherapy in oral carcinoma patients using a new regimen of cisplatin, 5-fluorouracil, and bleomycin alternating with methotrexate and epirubicin. *Cancer* 1999; 85: 1430-8.
- ⁷⁵ Andreadis C, Vahtsevanos K, Sidiras T, Thomaidis I, Antoniadis K, Mouratidou D. 5-Fluorouracil and cisplatin in the treatment of advanced oral cancer. *Oral Oncol* 2003; 380-5.
- ⁷⁶ Harari PM. Epidermal growth factor receptor inhibition in oncology. *Endocr Relat Cancer* 2004; 11: 689-708.

-
- ⁷⁷ Baselga J, Pfister D, Cooper MR, Cohen R, Burtness B, Bos M, et al. Phase I studies of anti-epidermal growth factor receptor chimeric antibody C225 alone and in combination with cisplatin. *J Clin Oncol* 2000; 18: 904-14.
- ⁷⁸ Prewett M, Rockwell RF, Giorgio NA, Mendelsohn J, Scher HI, Goldstein NI. The biologic effects of C225, a chimeric monoclonal antibody to the EGFR, on human prostate cancer. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 1996; 19: 419-27.
- ⁷⁹ Huang SM, Harari PM. Epidermal growth factor receptor inhibition in cancer therapy: biology, rationale and preliminary clinical results. *Invest New Drugs* 1999; 17: 259-69
- ⁸⁰ Petit AM, Rak J, Hung MC, Rockwell P, Goldstein N, Fendly B, et al. Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and ErbB-2/neu receptor tyrosine kinases down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumor cells in vitro and in vivo: angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumors. *Am J Pathol* 1997; 15:1523-30.
- ⁸¹ Bonner JA, Giralt J, Harari PM, Cohen R, Jones C, Sur RK, et al. Cetuximab prolongs survival in patients with locoregionally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: a phase III study of high dose radiation therapy with or without cetuximab. *Proc of Am Soc Clin Oncol* 2004; 23. Abstract 5507.
- ⁸² Ciardiello F. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors as anticancer agents. *Drugs* 2000; 60 (Suppl 1): 25-32.
- ⁸³ Ciardiello F, Caputo R, Bianco R, Damiano V, Pomatico G, De Placido S, et al. Antitumor effect and potentiation of cytotoxic drugs activity in human cancer cells by ZD-1839 (Iressa), an epidermal growth factor receptor-selective tyrosine kinase inhibitor. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 2053-63.
- ⁸⁴ Shintani S, Li C, Mihara M, Yano J, Terakado N, Nakashiro K, et al. Gefinitib ("Iressa", ZD1839), an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, up-regulates p27^{KIP1} and induces G1 arrest in oral squamous cell carcinoma cell lines. *Oral Oncol* 2004; 40: 43-51.

- ⁸⁵ Shintani S, Li S, Mihara M, Terakado N, Yano J, Nakashiro K, et al. Enhancement of tumor radioresponse by combined treatment with Gefitinib (Iressa, ZD1839), an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, is accompanied by inhibition of DNA damage repair and cell growth in oral cancer. *Int J Cancer* 2003; 107: 1030-7.
- ⁸⁶ Gastman BR. Apoptosis and its clinical impact. *Head Neck* 2001; 23: 409-25.
- ⁸⁷ Los M, Burek CJ, Stroh C, Benedyk K, Hug H, Mackiewicz A. Anticancer drugs of tomorrow: apoptotic pathways as targets for drug design. *Frug Discov Today* 2003; 8: 67-77.
- ⁸⁸ Hersey P, Zhang XD. Overcoming resistance of cancer cells to apoptosis. *J Cell Physiol* 2003; 196: 9-18.
- ⁸⁹ Lundenberg AS, Wienberg RA. Control of the cell cycle and apoptosis. *Eur J Cancer* 1999; 35: 1886-94.
- ⁹⁰ Todd R, Hinds PW, Munger K, Rustgi AK, Opitz OG, Suliman Y, Wong DT. Cell cycle dysregulation in oral cancer. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13: 51- 61.
- ⁹¹ Lewin B. Ciclo de la célula y regulación del crecimiento. En: Lewin B, ed. *Genes VII*. Marbán; Madrid; 2001. p. 835-74.
- ⁹² Schneider BL, Kulesz-Martin M. Destructive cycles: the role of genomic instability and adaptation in carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2004; 25: 2033-44.
- ⁹³ Line SRP, Lopes MA, Zaia AA. As alterações gênicas e o desenvolvimento do câncer bucal. *Rev Assoc Paul Cir Dent* 1998; 52: 241-4.
- ⁹⁴ Coletta RD, Graner E, Lopes MA. Os avanços da biología molecular e o câncer bucal. *Rev Assoc Paul Cir Dent* 2002; 56: 62-7.
- ⁹⁵ Todd R, Donoff RB, Wong DTW. The molecular biology of oral cancer: toward a tumor progression model. *J Oral Maxillofac Surg* 1997; 55: 213-23.

- ⁹⁶ Xia W, Lau YK, Zhang HZ, Xia FY, Johnston DA, Liu AR. Combination of EGFR, HER-2/neu, and HER-3 is a stronger predictor for the outcome of oral squamous cell carcinoma than any individual family members. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 4164-74.
- ⁹⁷ Todd R, Wong DTW. Epidermal growth factor receptor (EGFR) biology and human oral cancer. *Histol Histopathol* 1999; 14: 491-500.
- ⁹⁸ Williams HK. Molecular pathogenesis of oral squamous carcinoma. *J Clin Pathol Mol Pathol* 2000; 53: 165-72.
- ⁹⁹ Ulrich A, Coussens L, Hayflick JS, Dull TJ, Gray A, Tam AW et al. Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* 1984; 309: 418-25.
- ¹⁰⁰ Gullick WJ. Prevalence of aberrant expression of de epidermal growth factor in human cancers. *Br Med Bull* 1991; 47: 87- 98.
- ¹⁰¹ Partridge M, Gullick WJ, Langdom JD, Sherriff M. Expression of epidermal growth factor receptor in oral squamous cell carcinoma. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1988; 26: 381- 9.
- ¹⁰² O-charoenrat P, Rhys-Evans P, Modtahedi H, Eccles SA. The role of the *c-erbB* receptors and ligands in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2002; 38: 627-40.
- ¹⁰³ Scully C. Oncogenes, tumor supressor genes, and viruses in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 1993; 22: 337-47
- ¹⁰⁴ Rubin Grandis J, Tweardy DJ, Melhem MF. Asynchronous modulation of transforming growth factor- α and epidermal growth factor receptor protein expression in progression of premalignant lesions to head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 13-20.

- ¹⁰⁵ Shin DM, Ro JY, Hong WK, Hittelman WN. Dysregulation of epidermal growth factor receptor expression in premalignant lesions during head and neck tumorigenesis. *Cancer Res* 1994; 54: 3153-9
- ¹⁰⁶ Christensen ME, Therkildsen MH, Poulsen SS, Bretlau P. Immunoreactivity transforming growth factor alpha and epidermal growth factor in oral squamous cell carcinomas. *J Pathol* 1993; 169: 323-8.
- ¹⁰⁷ Santini J, Formento JL, Francoual M, Milano G, Schneider M, Dassonville O, et al. Characterisation, quantification and potential clinical value of epidermal growth factor receptor in head and neck carcinomas. *Head Neck* 1991; 13: 132-9.
- ¹⁰⁸ Kutton NAA, Govard I, Bhak NM. Epidermal growth factor receptor (EGFR) in oral squamous cell carcinomas: overexpression, localization, and therapeutic implications. *Indian J Dent Res* 1997; 8: 9-18.
- ¹⁰⁹ Herbst RS, Shin DM. Monoclonal antibodies to target epidermal growth factor-positive tumors. *Cancer* 2002; 94: 1593-611.
- ¹¹⁰ Rubin Grandis J, Melhem MF, Gooding WE, Day R, Holst VA, Wagener MM, et al. Levels of TGF- alpha and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 824-32.
- ¹¹¹ Nagatsuka H, Ishiwari Y, Tsujigiwa H, Nakano K, Nagai N. Quantitation of epidermal growth factor gene amplification by competitive polymerase chain reaction in pre-malignant and malignant oral epithelial lesions. *Oral Oncol* 2001; 37: 599-604.
- ¹¹² Bergler W, Bier H, Ganzer U. The expression of epidermal growth factor receptors in the oral mucosa of patients with oral cancer. *Arch Otorhinolaryngol* 1989; 246: 121-5.
- ¹¹³ Christensen ME, Engbaeck F, Therkildsen, Bretlau P, Nexø E. A sensitive enzyme-linked immunosorbent assay used for quantitation of epidermal growth factor receptor protein in head and neck carcinomas: evaluation, interpretations and limitations. *Br J Cancer* 1995; 72: 1487-93.

-
- ¹¹⁴ Rubin Grandis J, Melhem MF, Barnes EL, Tweardy DJ. Quantitative immunohistochemical analysis of transforming growth factor α and epidermal growth factor receptor in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* 1996; 78: 1284-92.
- ¹¹⁵ van Oijen MGCT, Rijkssen G, ten Broek FW, Slootweg. Increased expression of epidermal growth factor receptor in normal epithelium adjacent to head and neck carcinomas independent of tobacco and alcohol abuse. *Oral Dis* 1998; 4: 4-8.
- ¹¹⁶ Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 1993; 366: 704-7.
- ¹¹⁷ Gleich LL, Salamone FM. Molecular genetics of head and neck cancer. *Cancer Control* 2002; 9: 369-78.
- ¹¹⁸ Fortin A, Guerry M, Guerry R, Talbot M, Parise O, Schwaab G, et al. Chromosome 11q13 gene amplifications in oral and oropharyngeal carcinomas: no correlation with subclinical lymph node invasion and disease recurrence. *Clin Canc Res* 1997; 3: 609-14.
- ¹¹⁹ Bova RJ, Quinn DI, Nankervis JS, Cole IE, Sheridan BF, Jensen MJ, et al. Cyclin D1 and p16INK4A expression predict reduced survival in carcinoma of the anterior tongue. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 2810-9.
- ¹²⁰ Kinzler KW, Vogelstein B. Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature* 1997; 386: 761-3.
- ¹²¹ Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991; 253: 249-53.
- ¹²² Hardisson D. Molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2003; 260: 502-8.
- ¹²³ Vogelstein B, Kinzier KW. The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 1993; 9: 139-41.

- ¹²⁴ Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 1993, 75: 805-16.
- ¹²⁵ Sidransky D, Boyle J, Koch W. Molecular screening: Prospects for a new approach. *Arch Head Neck Surg* 1993; 119: 1187-90.
- ¹²⁶ Cruz I, Napier SS, van der Waal I, Snijders PJ, Walboomers JM, Lamey PJ, et al. Suprabasal p53 immunoexpression is strongly associated with high grade dysplasia and risk for malignant transformation in potentially malignant oral lesions from Northern Ireland. *J Clin Pathol* 2002; 55: 98-104.
- ¹²⁷ Nylander K, Dalbesteen E, May PA. The p53 molecule and its prognostic role in squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Oral Pathol Med* 2000; 29: 413-25.
- ¹²⁸ Kamer AR, Krebs L, Hoghooghi SA, Liebow C. Proliferative and apoptotic responses in cancers with special reference to oral cancer. *Crit Rev Oral Biol Med* 1999; 10: 58-78.
- ¹²⁹ Kawamata N, Moresetti R, Miller CW, Park D, Spirin KS, Nakamaki T, et al. Molecular analysis of the cyclin-dependent kinase inhibitor gene p27/kip1 in human malignancies. *Cancer Res* 1995; 55: 2266-9.
- ¹³⁰ Bloom J, Pagano M. Deregulated degradation of cdk inhibitor p27 and malignant transformation. *Semin Cancer Biol* 2003; 13: 41-7.
- ¹³¹ Kudo Y, Kitajima S, Ogawa I, Miyauchi M, Takata T. Down-regulation of Cdk inhibitor p27 in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2004; 41: 105-16.
- ¹³² Shintani S, Mihara M, Nakahara Y, Kiyota A, Ueyama Y, Matsumura, et al. Expression of cell cycle control proteins in normal epithelium, premalignant and malignant lesions of oral cavity. *Oral Oncol* 2002; 38: 235-43.

- ¹³³ Schoelch ML, Regezi JA, Dekker NP, Ng IOL, McMillan A, Ziober BL, et al. Cell cycle proteins and the development of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 1999; 35: 333-42.
- ¹³⁴ Kudo Y, Takata T, Ogawa I, Zhao M, Sato S, Takekoshi T, et al. Reduced expression of p27^{Kip1} correlates with an early stage of cancer invasion in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Lett* 2000; 151: 217-22.
- ¹³⁵ Kudo Y, Takata T, Yasui W, Ogawa I, Miyauchi M, Takekoshi T, et al. Reduced expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is an indicator of malignant behavior in oral squamous cell carcinoma. *Cancer* 1998; 83: 2447-55.
- ¹³⁶ Pardee AB. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* 1989; 246: 603-8.
- ¹³⁷ Baak JP. Mitosis counting in tumors. *Hum Pathol* 1990; 21: 683-5.
- ¹³⁸ Johnson SE, Bond VP. A method of labelling tissues with triitated thymidine in vitro and its use in comparing rates of cellular proliferation in duct epithelium fibroadenoma and carcinoma of the human breast. *Cancer* 1961; 14: 639-50.
- ¹³⁹ Dean PN, Dolbeare F, Gratzner H, Rice GC, Gray JW. Cell cycle analysis using a monoclonal antibody to BrUrd. *Cell Tissue Kinet* 1984; 17:427-36.
- ¹⁴⁰ Coltrera MD, Zarbo RJ, Sakr WA, Gown AM. Markers for dysplasia of the upper aerodigestive tract: Suprabasal expression of PCNA, p53, and CK19 in alcohol-fixed, embedded tissue. *Am J Pathol* 1999; 141: 817-25.
- ¹⁴¹ Taylor CR, Cote RJ. Immunohistochemical markers of prognostic value in surgical pathology. *Histol Histopathol* 1997; 12: 1039- 1055.
- ¹⁴² Koss LG, Czerniak B, Herz F, Wersto RP. Flow cytometric measurements of DNA and other cell components in human tumors: a critical appraisal. *Hum Pathol* 1989; 20: 528- 48.

- ¹⁴³ Warnakulasurya KA, Jonson NW. Importance of proliferation markers in oral pathology. In: Seifert G. Oral Pathology. Actual diagnostic and prognostic aspects. Berlin: Springer Editors; 1996. p. 147-77.
- ¹⁴⁴ Hall PA, Woods AL. Immunohistochemical markers of cell proliferation. Achievements, problems and prospects. An invited review. Cell Tissue Kinet 1990; 23: 505-22.
- ¹⁴⁵ Tsuji T, Sasaki K, Kimura Y, Yamada K, Mori M, Shinozaki F. Measurement of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and its clinical application in oral cancer. Int J Maxillofac Surg 1992; 21: 369-72 .
- ¹⁴⁶ Tsuji T, Shrestha P, Yamada K, Takagi H, Shinozaki F, Sasaki K, Maeda K, Mori M. Proliferating cell nuclear antigen in malignant and premalignant lesions of epithelial origin in the oral cavity and skin: an immunohistochemical study: Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol 1992; 420: 377-83 .
- ¹⁴⁷ Sasaki K, Murakami T, Kawasaki M, Takahashi M. The cell cycle associated change of the Ki-67 reactive nuclear antigen expression. J Cell Physiol 1987; 133: 579-84.
- ¹⁴⁸ Verheijen R, Kuijpers HJH, Schlingeman RO, Boehmer ALM, van Driel R, Brakenhoff GJ. Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen: 1. Intracellular localization during interphase. J Cell Sci 1989; 92: 123-30.
- ¹⁴⁹ Nogami T, Kuyama K, Yakamoto H. Histopathological and immunohistochemical study of malignant transformation of oral leukoplakia, with special reference to apoptosis-related gene products and proliferative activity. Acta Otolaryngol 2003; 123: 767-75.
- ¹⁵⁰ Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. J Cell Physiol 2000; 182: 311-22.
- ¹⁵¹ Key G, Kubbutat MH, Gerdes J. Assessment of cell proliferation by means of an enzyme-linked immunoabsorbent assay based on the detection of the ki-67 protein. J Immunol Methods 1994; 133: 1710- 5.

- ¹⁵² Dissanayake U, Johnson NW, Warnakulasurya KAAS. Comparison of cell proliferation in the centre and advancing fronts of oral squamous cell carcinomas using Ki-67 index. *Cell Prolif* 2003; 36: 255-64.
- ¹⁵³ Liu SC, Klein-Szanto AJ. Markers of proliferation in normal and leukoplakic oral epithelia. *Oral Oncol* 2000; 36: 145-51.
- ¹⁵⁴ Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984; 133: 1710-5.
- ¹⁵⁵ Mittal KP, Demopoulos RI, Goswani S. Proliferating cell nuclear antigen (cyclin) expression in normal and abnormal cervical squamous epithelia. *Am J Surg Pathol* 1993; 17: 117- 22.
- ¹⁵⁶ Warnakulasurya KAAS, MacDonald DG. Epithelial cell kinetics in oral leukoplakia. *J Oral Pathol Med* 1995; 24: 163- 9.
- ¹⁵⁷ García-Pola Vallejo MJ, Anitua Roldán MJ, Fernández Álvarez BE, García Martín JM, López Muñoz A. Estudio comparativo de la expresión del Ki-67 en el liquen plano oral y la leucoplasia oral. Análisis cuantitativo. *Med Oral* 2001; 6: 364-70.
- ¹⁵⁸ Gonzalez-Moles MA, Ruiz-Avila, I, Rodriguez-Archilla A, Martinez-Lara I. Suprabasal expression of Ki-67 antigen as a marker for the presence and severity of oral epithelial dysplasia. *Head Neck* 2000; 22: 658-61.
- ¹⁵⁹ Sudbo J, Reith A. Which putatively pre-malignant oral lesions become oral cancers? Clinical relevance of early targeting of high-risk individuals. *J Oral Pathol Med*. 2003; 2: 63-70.
- ¹⁶⁰ Iamaroon A, Khemaleelakul U, Pongsiriwet S, Pintong J. Co-expression of the p53 and Ki-67 and lack of EBV expression in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2004; 33: 30-6.

- ¹⁶¹ Tumuluri V, Thomas GA, Fraser IS. Analysis of the Ki-67 antigen at the invasive tumor front of human oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2002; 31: 598-604.
- ¹⁶² Matsumoto M, Komiyama K, Okaue M, Shimoyama Y, Iwakami K, Namaki S, et al. Predicting tumor metastasis in patients with oral cancer by means of the proliferation marker Ki-67. *J Oral Sci* 1999; 41: 53-6.
- ¹⁶³ Xie X, De Angelis P, Clausen OPF, Boyesen M. Prognostic significance of proliferative and apoptotic markers in oral tongue squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 1999; 35: 502-9.
- ¹⁶⁴ Thompsom PJ, Soames JV, Booth C, O'Shea JA. Epithelial cell proliferative activity and oral cancer progression. *Cell Prolif* 2002, 35: 583-9.
- ¹⁶⁵ Sittel C, Ruiz S, Volling P, Kvasnicka HM, Jungehulsing M, Eckel HE. Prognostic significance of Ki-67 (MIB1), PCNA and p53 in cancer of the oropharynx and oral cavity. *Oral Oncol* 1999; 35: 583-9.
- ¹⁶⁶ Chang F, Syrjanen S, Syrjanen K. Implications of the p53 tumor supressor gene in clinical oncology. *J Clin Oncol* 1995; 13: 1009-22.
- ¹⁶⁷ D'Ambrosio SM, Gibson-D'Ambrosio RE, Wani G, Casto B, Milo GE, Kelloff GJ, et a. Modulation of Ki67, p53 and RARbeta expression in normal, premalignant and malignant human oral epithelial cells by chemopreventive agents. *Anticancer Res* 2001; 21: 3229-35.
- ¹⁶⁸ Kaufmann SH, Gores GJ. Apoptosis in cancer: cause and cure. *Bioessays* 2000; 301: 125-32.
- ¹⁶⁹ Levine AJ. P53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997; 88: 323-31.

- ¹⁷⁰ Lo Muzio L, Staibano S, Pannone G, Mignogna MD, Marigliò A, Salvatore S, et al. Expression of the apoptosis inhibitor survivin in aggressive squamous cell carcinoma. *Exp Mol Pathol* 2001; 70: 249-54.
- ¹⁷¹ Zornig M, Hueber A, Baum W, Evan G. Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1551: 31-7.
- ¹⁷² Strasser A, Huang DC, Vaux DL. The role of the bcl-2/ced-9 gene family in cancer and general implications of defects in cell death control for tumourigenesis and resistance to chemotherapy. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1333: F151-78.
- ¹⁷³ Polverini PJ, Nor JE. Apoptosis and predisposition to oral cancer. *Crit Rev Oral Biol Med* 1999; 10: 139-52.
- ¹⁷⁴ Saunders MW, Birchall MA. Apoptosis, matters of life and death. *J Laryngol Otol* 1998; 112: 822-6.
- ¹⁷⁵ Loro LL, Vintermyr OK, Johannssen AC. Cell death regulation in oral squamous cell carcinoma: methodological considerations and clinical significance. *J Oral Pathol Med* 2003; 32: 125-38.
- ¹⁷⁶ Schoelch ML, Le QT, Silverman S Jr, McMillan A, Dekker NP, Fu KK, et al. Apoptosis-associated proteins and the development of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 1999; 35: 77-85.
- ¹⁷⁷ Singh BB, Chandler FW Jr, Whitaker SB, Forbes-Nelson AE. Immunohistochemical evaluation of bcl-2 oncoprotein in oral dysplasia and carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998; 85: 692-8.
- ¹⁷⁸ Xie X, Clausen OP, De Angelis P, Boysen M. The prognostic value of spontaneous apoptosis, Bax, Bcl-2, and p53 in oral squamous cell carcinoma of the tongue. *Cancer* 1999; 86: 913-20.

- ¹⁷⁹ Scully C, Field JK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. *Oral Oncol* 2000; 256-63.
- ¹⁸⁰ Kanekawa A, Tsuji T, Oga A, Sasaki K, Shinozaki F. Chromosome 17 abnormalities in squamous cell carcinoma of the oral cavity, and its relationship with p53 and Bcl-2 expression. *Anticancer Res* 1999; 19: 81-6.
- ¹⁸¹ Nuñez G, Clarke MF. The Bcl-2 family of proteins: regulators of cell death and survival. *Trends Cell Biol* 1994; 4: 399-403.
- ¹⁸² Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 1994; 124: 1-6.
- ¹⁸³ Loro LL, Vintermyr OK, Liavaag PG, Jonsson R, Johannessen AC. Oral squamous cell carcinoma is associated with decreased Bcl-2/Bax expression ratio and increased apoptosis. *Hum Pathol* 1999; 30: 1097-105.
- ¹⁸⁴ Ito T, Fujieda S, Tsuzuki H, Sunaga H, Fan G, Sugimoto C, et al. Decreased expression of Bax is correlated with poor prognosis in oral and oropharyngeal carcinoma. *Cancer Lett* 1999; 140: 81-91.
- ¹⁸⁵ Jordan RCK, Catzavelos GC, Barret AW, Apeight PM. Differential expression of Bcl-2 and bax in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oral Oncol Eur J Cancer* 1996; 32B: 394-400.
- ¹⁸⁶ Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 226-32.
- ¹⁸⁷ Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 1997; 3: 917- 21.
- ¹⁸⁸ Altieri DC. The molecular basis and potential role of survivin in cancer and diagnosis therapy. *Trend Mol Med* 2001; 7: 542-7.

-
- ¹⁸⁹ Tanaka C, Uzawa K, Shibahara T, Yokoe H, Noma H, Tanzawa H. Expression of an inhibitor of apoptosis, survivin, in oral carcinogenesis. *J Dent Res* 2003; 82: 607-11.
- ¹⁹⁰ Lo Muzio L, Pannone G, Leonardi R, Staibano MD, Mignogna MD, De Rosa G, et al. Survivin, a potential early marker predictor of tumor progression in the oral mucosa. *J Dent Res* 2003; 82: 923-8.
- ¹⁹¹ Weidner S, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl Med* 1991; 324: 1-8.
- ¹⁹² Ferrara N, Davis-Smith T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine Rev* 1997; 18: 4-25.
- ¹⁹³ Gupta K, Kshirsagar S, Li W, Gui L, Ramakrishnan S, Gupta P, et al. VEGF prevents apoptosis of human microvascular endothelial cells via opposing effects on MAPK/ERK and SAPK/JNK signalling. *Exp Cell Res* 1999; 247: 495-504.
- ¹⁹⁴ Relf M, LeJeune S, Scott PA, Fox S, Smith K, Leek R, et al. Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor beta-1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis. *Cancer Res* 1997; 57: 963-9.
- ¹⁹⁵ Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD, Cleary KR, Ellis LM. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res* 1995; 55:3964-8.
- ¹⁹⁶ Uchida S, Shimada Y, Watanabe G, Tanaka H, Shibagaki I, Miyahara T, et al. In oesophageal squamous cell carcinoma vascular endothelial growth factor is associated with p53 mutation, advanced stage and poor prognosis. *Br J Cancer* 1998; 77: 1704-9.
- ¹⁹⁷ Utehara M, Sano K, Ikeda H, Sekine J, Irie A, Yokota T, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and prognosis of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2004; 40: 321-5.

-
- ¹⁹⁸ Moriyama M, Kumagai S, Kawashiri S, Kojima K, Yamamoto E. Immunohistochemical study of tumor angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 1997; 33: 369-74.
- ¹⁹⁹ Schimming R, Reusch P, Kuschnierz J, Schmelzeisen R. Angiogenic factors in squamous cell carcinoma of the oral cavity: do they have prognostic relevance? *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004; 32: 176-81.
- ²⁰⁰ Yamamoto E, Miyakawa A, Kohama G. Mode of invasion and lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head Neck Surg* 1984; 6: 938-47.
- ²⁰¹ Fidler IJ. Tumour heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis. *Cancer Res* 1978; 38: 2651- 60.
- ²⁰² Smith MEF, Pignatelli M. The molecular histology of neoplasia: the role of the cadherin/catenin complex. *Histopathology* 1997; 31: 107-11.
- ²⁰³ Kleinman HK, Cannon FB, Laurie GW, Hassell JR, Aumalley M, Terranova VP, et al. Biological activities of laminin. *J Cell Biochem* 1985; 27: 317-25.
- ²⁰⁴ Burgeson RE, Chiquet M, Deutzmann R, Ekblom P, Engel J, Kleinman H, et al. A new nomenclature for the laminins. *Matrix Biol* 1994; 14: 209-11.
- ²⁰⁵ Skyldberg B, Salo S, Eriksson E, Aspenblad U, Moberger B, Tryggvason K, Auer G. Laminin-5 as a marker of invasiveness in cervical lesions. *J Nat Cancer Inst* 1999; 91; 1882-7.
- ²⁰⁶ Koshikawa N, Moriyama K, Takamura H, Mizushima H, Nagashima Y, Yanoma S, et al. Overexpression of laminin γ 2 chain monomer in invading gastric carcinoma cells. *Cancer Res* 1999; 59: 5596- 61.
- ²⁰⁷ Miyazaki K, Kikkawa Y, Nakamura, Yasumitsu H, Umeda M. A large cell-adhesive scatter factor secreted by human gastric carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90: 11767-71.

-
- ²⁰⁸ Giannelli G, Falk- Marzillier J, Schiraldi O, Stetler-Stevenson WG, Quaranta V. Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5. *Science* 1997; 277: 225-8.
- ²⁰⁹ Bänkfalvi A, Piffko J. Prognostic and predictive factors in oral cancer: The role of the invasive tumour front. *J Oral Pathol Med* 2000; 29: 291-8.
- ²¹⁰ Pyke C, Romer J, Kallunki P, Lund LR, Ralfkaer E, Dano K, Tryggvason K. The $\gamma 2$ chain of kalinin/laminin 5 is preferentially expressed in invading malignant cells in human cancers. *Am J Pathol* 1994; 145: 782-91.
- ²¹¹ Bryne M. Is the invasive front of an oral carcinoma the most important area for prognostication? *Oral Dis* 1998; 4: 70-7.
- ²¹² Yakamoto H, Itoh F, Shouhei I, Hosokana M, Imai K. Expression of the γ chain of laminin-5 at the invasive front is associated with recurrence and poor prognosis in esophageal squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 896-900.
- ²¹³ Lenander C, Habermann SK, Ost A, Wilsson B, Shimmelpeening H, Trggvason K, Auer G. Laminin-5 gamma 2 chain expression correlated with unfavourable prognosis in colon carcinomas. *Anal Cell Pathol* 2001; 22: 201-9.
- ²¹⁴ Morya Y, Niki T, Yamada T, Matsuno Y, Kondo H, Hirohashi S. Increased expression of laminin-5 and its prognostic significance in small-size lung adenocarcinoma: an immunohistochemical analysis of 102 cases. *Cancer* 2001; 91: 1129-41.
- ²¹⁵ Nordemar S, Högmö A, Lindholm J, Auer G, Munck-Wikland E. Laminin-5 $\gamma 2$: a marker to identify oral mucosal lesions at risk for tumor development? *Anticancer Res* 2003; 23: 4985-90.
- ²¹⁶ Ono Y, Nakanishi Y, Ino Y, Niki T, Yamada T, Yoshimura K, et al. Clinicopathologic significance of laminin-5 $\gamma 2$ chain expression in squamous cell carcinoma of the tongue. Immunohistochemical analysis of 67 lesions. *Cancer* 1999; 85: 2315-21.

-
- ²¹⁷ Katoh K, Nakanishi Y, Akimoto S, Yoshimura K, Takagi M, Sakamoto M, et al. Correlation between laminin-5 γ 2 chain expression and epidermal growth factor receptor expression and its clinicopathological significance in squamous cell carcinoma of the tongue. *Oncology* 2002; 62: 318-26.
- ²¹⁸ Stoltzfus P, Hogmo A, Lindholm J, Aspenblad U, Auer G, Munck-Wikland E. The gamma2 chain of laminin-5 as an indicator of increased risk for recurrence in T1 stage tongue cancer. *Anticancer Res.* 2004; 24: 3109-14.
- ²¹⁹ Sakaki T, Tamura I, Kadota H, Kakudo K. Changing expression of E-and P-cadherin during rat tongue carcinogenesis induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. *J Oral Pathol Med* 2003; 32: 530-7.
- ²²⁰ Lewis JE, Jensen PJ, Johnson KR, Wheelock MJ. E-cadherin mediates adherens junction organisation through protein kinase C. *J Cell Sci* 1995; 107: 3615-21.
- ²²¹ Knusden KA, Soler AP, Johnson KP, Wheelock MJ. Interactions of alpha-actin with the cadherin catenin cell- cell adhesion complex via α -catenin. *J Cell Biol* 1995; 130: 67-77.
- ²²² Larue L, Antos C, Butz S, Huber O, Delmas V, Dominis M, et al. A role for cadherins in tissue formation. *Development* 1996; 122: 3185-94.
- ²²³ Downer CS, Speight M. E-cadherin expression in normal, hyperplastic and malignant oral epithelium. *Eur J Cancer Oral Oncol* 1993; 29B: 3003-5.
- ²²⁴ Bankfalvi A, Krabort M, Végh A, Felszeghy E, Piffkó J. Deranged expression of the E-cadherin/ β -catenin complex and the epidermal growth factor receptor in the clinical evolution and progression of oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol* 2002; 31: 450-7.
- ²²⁵ Shimoyana Y, Hirohashi S. Cadherin intercellular adhesion molecule in hepatocellular carcinomas; loss of E-cad expression in an undifferentiated carcinoma. *Cancer Lett* 1999; 57: 2185-91.

-
- ²²⁶ Mayer B, Johnson JP, Leitl F, Jauch KW, Heiss MM, Schildberg FW, et al. E-cad expression in primary and metastatic gastric cancer; down regulation correlates with cellular dedifferentiation and glandular disintegration. *Cancer Res* 1993; 53: 1690-5.
- ²²⁷ Andrews NA, Jones AS, Helliwel TR, Kinsella AR. Expression of the cell-cell adhesion molecule E-cadherin in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Otolaryngol* 1993; 18: 196-201.
- ²²⁸ Mattijssen V, Peters HM, Schalkwijk L, Manni JJ, van 't Hof-Grootenboer B, de Mulder PH, et al. E-cadherin expression in head and neck squamous cell carcinoma is associated with clinical outcome. *Int J Cancer* 1993; 55: 580-5.
- ²²⁹ Shinohara M, Hiraki A, Ikebe T, Nakamura S, Kurahara S, Shirasuna K, et al. Immunohistochemical study of desmosomes in oral squamous cell carcinoma: correlation with cytokeratin and E-cadherin staining, and with tumour behavior. *J Pathol* 1998; 184: 369-71.
- ²³⁰ Chow V, Yuen AP, Lam KY, Tsao GS, Ho WK, Wei WI. A comparative study of the clinicopathological significance of E-cadherin and catenins (alpha, beta, gamma) expression in the surgical management of oral tongue carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001; 127: 59-63.
- ²³¹ Yoshiura K, Kanai Y, Ochiai A, Shimoyama Y, Sugimura T, Hirohashi S. Silencing of the E-cadherin invasion-suppressor gene by CpG methylation in human carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 7416-9.
- ²³² Nephew KP, Huang THM. Epigenetic gene silencing in cancer initiation and progression. *Cancer Lett* 2003; 190: 125-33.
- ²³³ Ehrlich M. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues or cells. *Nucleic Acids Res* 1982; 10: 2709-2721.
- ²³⁴ Fan CY. Epigenetic alteration in head and neck cancer: prevalence, clinic significance and implications. *Curr Oncol Rep* 2004; 6: 152-61.

- ²³⁵ Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 3225-9.
- ²³⁶ Viswanathan M, Tsuchida N, Shanmungam G. Promoter hypermethylation profile of tumor-associated genes p16, p15, hMLH1, MGMT, and E-cadherin in oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2003; 105: 41-6.
- ²³⁷ von Zeidler SV, Miracca EC, Nagai MA, Birman EG. Hypermethylation of the p16 gene in normal oral mucosa of smokers. *Int J Mol Med* 2004; 14: 807-11.
- ²³⁸ Kresty LA, Mallery SR, Knobloch TJ, Song H, Lloyd M, Casto BC, et al. Alterations of p16(INK4a) and p14(ARF) in patients with severe oral epithelial dysplasia. *Cancer Res* 2002, 62: 5295- 300.
- ²³⁹ Esteller M. DNA methylation and cancer therapy: new developments and expectations. *Curr Opin Oncol* 2005; 17: 55-60.
- ²⁴⁰ Ministerio de Sanidad y Consumo. Clasificación Internacional de Enfermedades. 9ª revisión. Madrid: INSALUD; 1998. p. 82-6.
- ²⁴¹ Gonzalez-Moles M, Esteban F, Rodríguez-Archilla A, Ruiz-Avila, Gonzalez-Moles S. Importance of tumour thickness measurement in prognosis of tongue cancer. *Oral Oncol* 2002; 38: 394-7.
- ²⁴² Rahima B, Shingaki S, Nagata M, Saito C. Prognostic significance of perineural invasion in oral and opharyngeal carcinoma. *Oral Surg Oral Pathol Oral Med Oral Radiol Endod* 2004; 97: 423-31.
- ²⁴³ Frade González C, García-Caballero T, Lozano Ramírez A, Labella Caballero T. Proliferación celular en tumores de glándulas salivales. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2001; 52: 456-60.
- ²⁴⁴ Gamboa-Rodríguez A, Domínguez-Fonseca C, Quintanilla-Martínez L, Reyes-Gutierrez, Green D, Angeles-Angeles A, et al. Epidermal growth factor receptor expresión correlates with poor survival in gastric adenocarcinomas from Mexican

patients: a multivariate analysis using a standardized immunohistochemical detection system. *Mod Pathol* 2004; 17: 579-87.

²⁴⁵ Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958; 53: 457-81.

²⁴⁶ Altman DG, Bland JM. Statistics Notes: Presentation of numerical data. *BMJ* 1996; 312: 572.

²⁴⁷ Simpson RJ, Johnson TA, Amara IA. The box-plot: an exploratory analysis for biomedical publications. *Am Heart J* 1988; 116: 1663-5

²⁴⁸ Bravo Perez . Bioestadística. Principios, métodos y aplicaciones en odontología. En: Cuenca Sala E, Manau Navarro C, Serra Majen, eds. 2ª ed. Odontología preventiva y comunitaria. Principios métodos y aplicaciones. Barcelona: Masson; 2003. p. 285-301.

²⁴⁹ Boyle P, Macfarlane GJ, Maisonneuve P, Zheng T, Scully C, Tedesco B. Epidemiology of mouth cancer in 1989: a review. *J R Soc Med* 1990; 83: 724-30.

²⁵⁰ Smith CJ. Oral cancer and precancer: background, epidemiology and aetiology. *Br Dent J* 1998; 167: 377- 383.

²⁵¹ Chen J, Katz RV, Krutchkoff DJ, Eisenberg E. Lip cancer. Incidence trends in Connecticut, 1935-1985. *Cancer* 1992; 70: 2025-30.

²⁵² Whitehurst JO, Droulias CA. Surgical management of cancer of the tongue. *Surg Clin North Am* 1974; 54: 759-65.

²⁵³ Decroix Y, Ghossein NA. Experience of the Curie Institute in treatment of cancer of the mobile tongue. II. Management of neck nodes. *Cancer* 1981, 47: 503-8.

²⁵⁴ Silva SD, Agostini M, Nishimoto I, Colleta RD, Alves FA, Lopes MA, et al. Expression of fatty acid synthase, ErbB2 and Ki-67 in head neck squamous cell carcinoma. A clinicopathological study. *Oral Oncol* 2004; 40: 688-96.

²⁵⁵ Silverman S Jr, Gorsky M. Epidemiologic and demographic update in oral cancer. California and national data- 1973-1985. *J Am Dent Assoc* 1990; 495-9.

- ²⁵⁶ Izarzugaza MI, Esparza H, Aguirre JM. Epidemiological aspects of oral and pharyngeal cancers in the Basque Country. *J Oral Pathol Med* 2001; 30: 521-6.
- ²⁵⁷ Godwin JS, Hunt WC, Janet JM. Determinants of cancer therapy in elderly patients. *Cancer* 1993; 72: 594-601.
- ²⁵⁸ Reichard KW, Joseph KT, Cohen M, Greager JA. Squamous cell carcinoma of the tongue: Experience with 86 consecutive cases. *J Surg Oncol* 1993; 54: 239-42.
- ²⁵⁹ El-Husseiny G, Kandil A, Jamshed A, Khafaga Y, Saleem M, Allam A, et al. Squamous cell carcinoma of the tongue: an analysis of prognostic factors. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2000; 38: 193- 9.
- ²⁶⁰ Varela-Centelles PI, Seoane J, Vazquez Fernandez E, De La Cruz A, Garcia Asenjo JA. Survival to oral cancer. A study of clinical risk markers with independent prognostic value. *Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol.* 2002; 44: 46-51.
- ²⁶¹ Mackenzie J, Ah-See, Takker N, Sloan P, Maran AG, Birch J, et al. Increasing incidence of oral cancer amongst young persons: what is the aetiology? *Oral Oncol* 2000; 36: 387-9.
- ²⁶² Oliver RJ, Dearing J, Hindle I. Oral cancer in young adults: report of three cases and review of the literature. *Br Dent J* 2000; 188: 362-6.
- ²⁶³ Llewellyn CD, Johnson N, Warnakulasuriya S. Factors associated with delay presentation among younger patients with oral cancer. *Oral Surg Oral Pathol Oral Med Oral Endod Radiol* 2004; 97: 707-13.
- ²⁶⁴ Llewellyn CD, Linklater K, Bell J, Johnson N, Warnakulasuriya S. An analysis of risk factors for oral cancer in young people: a case-control study. *Oral Oncol* 2004; 304-313.
- ²⁶⁵ Sarkaria JN, Harari PM. Oral tongue cancer in young adults less than 40 years of age: rationale for aggressive therapy. *Head Neck* 1994; 16: 107-11.

-
- ²⁶⁶ Rennie JS, McGregor AD. Intra-oral squamous cell carcinoma in patients under 40 years of age. A report of 13 cases and review of the literature. *Br J Plastic Surg* 1987; 40: 270-3.
- ²⁶⁷ Sasaki T, Moles DR, Imai Y, Speight PM. Clinico-pathological features of squamous cell carcinoma of the oral cavity in patients <40 years of age. *J Oral Pathol Med* 2005; 34: 129-33.
- ²⁶⁸ Tanaka N, Ogi K, Odajima T, Dehari H, Yamada S, Sonoda T, Kohama G. PRb2/p130 protein expression is correlated with clinicopathologic findings in patients with oral squamous cell carcinoma. *Cancer* 2001; 92: 2117-25.
- ²⁶⁹ Jones AS, Cook JA, Phillips DE, Roland NJ. Squamous carcinomas presenting as an enlarged lymph node. *Cancer* 1993; 72: 1756-61.
- ²⁷⁰ Lindberg R. Distribution of cervical lymph node metastases from squamous cell carcinoma of the upper respiratory and digestive tracts. *Cancer* 1972; 29: 1446-9.
- ²⁷¹ Sobin LH, Wittekind C, UICCTNM classification of malignant tumours. 6th ed. New York: Wiley-Liss, Inc; 2002.
- ²⁷² Baredes S, Leeman DJ, Chen TS, Mohit-Tabataba MA. Significance of tumour thickness in soft palate carcinoma. *Laryngoscope* 1993; 103: 389-93.
- ²⁷³ Martinez-Gimeno C, Rodríguez EM, Vila CN, Varela CL. Squamous cell carcinoma of the oral cavity: a clinicopathologic scoring system for evaluating risk for cervical lymph node metastasis. *Laryngoscope* 1995; 105: 728-33.
- ²⁷⁴ Gorsky M, Epstein JB, Oakley C, Le ND, Hay J, Stevenson-Moore P. Carcinoma of the tongue: A case series analysis of clinical presentation, risk factors, staging, and outcome. *Oral Surgery Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 98: 546-52.
- ²⁷⁵ Bundgaard T, Bentzen SM, Wildt J, Sorensen FB, Sogaard H, Nielsen JE. Histopathologic, stereologic, epidemiologic, and clinical parameters in the prognostic evaluation of squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head Neck* 1996; 18: 142-52.

- ²⁷⁶ Woolgar JA, Scott J. Prediction of cervical lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of the tongue/floor of mouth. *Head Neck* 1995; 17: 463-72.
- ²⁷⁷ Anneroth G, Batsakis J, Luna M. Review of the literature and recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. *Scand J Dent Res* 1987; 95: 229-49.
- ²⁷⁸ Hiratsuka H, Miyahawa A, Nakamori K, Kido Y, Sunakawa H, Kohama G. Multivariate analysis of occult lymph node metastasis as a prognostic indicator for patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer* 1997; 80: 351-6.
- ²⁷⁹ Bundgaard T, Rossen K, Henriksen S, Charabi S, Soogaard H, Grau C. Histopathologic parameters in the evaluation of T1 squamous cell carcinomas of the oral cavity. *Head Neck* 2002; 24: 256-60.
- ²⁸⁰ Lopes MA, Nikitakis NG, Reynolds MA, Ord RA, Sauk Jr J. Biomarkers of lymph node metastases in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg* 2002; 60: 142-7.
- ²⁸¹ Howaldt HP, Frenz M, Pitz H. Proposal for a modified T-classification for oral cancer. The DOSAK. *J Craniomaxillofac Surg* 1993; 21: 96-101.
- ²⁸² Spiro RH, Huvos AG, Wong GY, Spiro JD, Gnecco CA, Strong EW. Predictive value of tumor thickness in squamous carcinoma confined to the tongue and floor of the mouth. *Am J Surg* 1986; 152: 354-50.
- ²⁸³ Brown B, Barnes L, Mazariegos J, Taylor F, Johnson J, Wagner RL. Prognostic factors in mobile tongue and floor of the mouth carcinoma. *Cancer* 1989; 64: 1195-202.
- ²⁸⁴ Asakage T, Yokose T, Mukai K, Tsugane S, Tsubono Y, Asai M, Ebihara S. Tumor thickness predicts cervical metastasis in patients with stage I/II carcinoma of the tongue. *Cancer* 1998; 82: 1443-8.
- ²⁸⁵ Mohit-Tabatai MA, Sobel HJ, Rush BF, Mashberg A. Relation of thickness of floor of mouth stage I and II cancers to regional metastasis. *Am J Sur* 1986; 152: 351-3.

- ²⁸⁶ Myers JN, Eckins T, Roberts D, Byers RM. Squamous cell carcinoma of the tongue in young adults: increasing incidence and factors that predict treatment outcomes. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2000; 222: 244-51.
- ²⁸⁷ Urist MM, O'Brien CJ, Soong SJ, Visscher DW, Maddox WA. Squamous cell carcinoma of the the buccal mucosa: analysis of prognostic factors. *Am J Surg* 1987; 154: 411-4.
- ²⁸⁸ Kurokawa H, Yamashita Y, Takeda S, Zhang M, Fukuyama H, Takahashi T. Risk factors for late cervical lymph node metastasis in patients with stage 1 or 2 carcinoma of the tongue. *Head Neck* 2002; 24: 731-6.
- ²⁸⁹ Brown B, Barnes L, Mazariegos J, Taylor F, Johnson J, Wagner RL. Prognostic factors in mobile tongue and floor of mouth carcinoma. *Cancer* 1989; 64:1195-202.
- ²⁹⁰ Rahima B, Shingaki S, Nagata M, Saito S. Prognostic significance of perineural invasion in oral and oropharyngeal carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 97: 423-31.
- ²⁹¹ Brown B, Barnes L, Mazariegos J, Taylor F, Johnson J, Wagner RL. Prognostic factors in mobile tongue and floor of mouth carcinoma. *Cancer* 1989; 64: 1195-202.
- ²⁹² Loore TR, Strong EW. Significance of positive margins in oral cavity squamous carcinoma. *Am J Surg* 1990; 106: 410-4.
- ²⁹³ Sutton DN, Brown JS, Rogers SN, Vaughan ED, Woolgar JA. The prognostic implications of the surgical margin in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2003; 32: 30-4.
- ²⁹⁴ Kovács AF. Relevance of positive margins in case of adjuvant therapy of oral cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004; 33: 447-53.
- ²⁹⁵ Zelefsky MJ, Harrison LB, Fass DE, Armstrong JG, Shah JP, Strong EW. Postoperative radiation therapy for squamous cell carcinomas of the oral cavity and

oropharynx: impact of therapy on patients with positive surgical margins. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1993; 25: 17-21.

²⁹⁶ McMahon J, O'Brien CJ, Pathak I, Hamill R, McNeil E, Hammersley N. Influence of condition of surgical margins on local recurrence and disease-specific survival in oral and oropharyngeal cancer. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2003; 41: 224-31.

²⁹⁷ Yuen APW, Lam KY, Chan ACL, Wei WI, Lam LK. Clinicopathological analysis of local spread of carcinoma of the tongue. *Am J Surg* 1998; 175: 242-4.

²⁹⁸ Brennan JA, Mao L, Hruban RH, Boyle JO, Eby YJ, Koch WM, et al. Molecular assessment of histopathological staging in squamous cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 1995; 332: 429-35.

²⁹⁹ Partridge M, Li SR, Pateromichelakis S, Francis R, Phillips E, Huang XH, et al. Detection of minimal residual cancer to investigate why oral tumors recur despite seemingly adequate treatment. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 2718-25.

³⁰⁰ Bettendorf O, Piffko J, Bánkfalvi A. Prognostic and predictive factors in oral squamous cell cancer: important tools for planning individual therapy? *Oral Oncol* 2004; 40: 110-9.

³⁰¹ Oliver RJ, MacDonald DG, Felix DH. Aspects of cell proliferation in oral epithelial dysplastic lesions. *J Oral Pathol Med* 2000; 29: 49-55.

³⁰² Oliver RJ, MacDonald DG. G1 cyclins in oral epithelial dysplasias. *J Oral Pathol Med* 2001; 30: 80-6.

³⁰³ Tumulury V, Thomas GA, Fraser IS. The relationship of proliferating cell density at the invasive tumour front with prognostic and risk factors in human oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2004; 33: 204-8.

³⁰⁴ Carlos de Vicente J, Herrero-Zapatero A, Fresno MF, Lopez-Arranz JS. Expression of cyclin D1 and Ki-67 in squamous cell carcinoma of the oral cavity: clinicopathological and prognostic significance. *Oral Oncol* 2002, 38: 301-8.

- ³⁰⁵ Bortoluzzi MC, Yurgel LS, Dekker NP, Jordan RCK, Regezi JA. Assessment of p63 in oral squamous cell carcinomas and dysplasias. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 94: 698-704.
- ³⁰⁶ Piffko J, Bankfalvi A, Ofner D, Kusch F, Bocker W, Joos U. In situ assessment of cell proliferation at the invasive front of oral squamous cell carcinomas. *Virchows Arch* 1996; 429: 229-34.
- ³⁰⁷ Bettendorf O, Herrmann G. Prognostic relevance of Ki-67 antigen expression in 329 cases of oral squamous cell carcinoma. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2002; 64: 200-5.
- ³⁰⁸ Stoll C, Baretton G, Ahrens C, Lörs U. Prognostic significance of apoptosis and associates factors in oral squamous cell carcinoma. *Virchows Arch* 2000; 436: 102-8.
- ³⁰⁹ Bankfalvi A, Piffko J. Prognostic and predictive factors in oral cancer: The role of the invasive tumour front. *J Oral Pathol Med* 2000, 29: 291-8.
- ³¹⁰ Sakay H, Kawano K, Okamura K, Hashimoto N. Immunohistochemical localisation of c-myc oncogene product and EGF receptor in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 1990; 19: 1-4.
- ³¹¹ Kusakawa J, Harada H, Shima I, Sasaguri Y, Kaneyama T, Morimatsu M. The significance of epidermal growth factor receptor and matrix metalloproteinase-3 in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Eur J Cancer Oral Oncol* 1996; 32B: 217-21.
- ³¹² Field JK, Spandidos DA. Expression of oncogenes in human tumours with special reference to the head and neck region. *J Oral Pathol* 1987; 16: 97-107.
- ³¹³ Kręcicki T, Jelen M, Zalesska-Kręcicka M, Rak J, Szkudlarek T, Jelen-Krzeszewska J. Epidermal growth factor receptor (EGFR), proliferating cell nuclear antigen in laryngeal epithelial lesions. *Oral Oncol* 1999; 35: 180-6.

- ³¹⁴ Maiorano E, Favia G, Maisonnneuve, Viale G. Prognostic implications of epidermal growth factor receptor immunoreactivity in squamous cell carcinoma of the oral mucosa. *J Pathol* 1998; 185: 167-74.
- ³¹⁵ Bankfalvi A, Krabort M, Vegh A, Felszeghy E, Piffko J. Deranged expression of the E-cadherin/ β -catenin complex and the epidermal growth factor receptor in the clinical evolution and progression of oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 2002; 31: 450-7.
- ³¹⁶ Störkel S, Reichert T, Reiffen KA, Wagner W. EGFR and PCNA expression in oral squamous cell carcinomas- a valuable tool in estimating the patient's prognosis. *Oral Oncol Eur J Cancer* 1993; 273-7.
- ³¹⁷ Yamada Y, Takagi, M, Shioda S. Evaluation of epidermal growth factor receptor in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992; 73: 67-70.
- ³¹⁸ Ulanovski U, Stern Y, Roizman P, Shpitzer T, Popvtzer A, Feinmesser R. Expression of EGFR and Cerb-B2 as prognostic factors in cancer of the tongue. *Oral Oncol* 2004; 40: 532-7.
- ³¹⁹ Schartinger VL, Kacani L, Ardle J, Schwentner I, Wurm M, Obrist P, et al. Pharmacodiagnostic value of the HER family in head and neck squamous cell carcinoma. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2004; 66: 21-6.
- ³²⁰ Lim SC, Zhang S, Ishii G, Endoh Y, Kodama K, Miyamoto S, et al. Predictive markers for late cervical metastasis in stage I and II invasive squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 166-72.
- ³²¹ Tanaka N, Odajima T, Ogi K, Ikeda T, Satoh M. Expression of E-cadherin, α -catenin, and β - catenin in the process of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2003; 89: 557-63.

-
- ³²² Bankfalvi A, Krabort M, Buchwalow IG, Végh A, Felszeghy E, Piffkó J. Gains and losses of adhesion molecules (CD44, E-cadherin, and β -catenin) during oral carcinogenesis and tumor progression. *J Pathol* 2002; 198: 343-51.
- ³²³ Bagutti C, Speight PM, Watt FM. Comparison of integrin, cadherin, and catenin expression in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *J Pathol* 1998; 186: 8-16.
- ³²⁴ Shinohara M, Hiraki A, Ikebe T, Nakamura S, Kurahara SI, Shirasuna K. Immunohistochemical study of desmosomes in oral squamous cell carcinoma: correlation with cytokeratin and e-cadherin staining, and with tumour behaviour. *J Pathol* 1998; 184: 369-81.
- ³²⁵ Birchmeier W, Weidner KM, Hulsken J, Behrens J. Molecular mechanisms leading to cell junction (cadherin) deficiency in invasive carcinomas. *Semin Cancer Biol* 1993; 4: 231-9.
- ³²⁶ Takes RP. Staging of the neck in patients with head and neck squamous cell cancer: Imaging techniques and biomarkers. *Oral Oncol* 2004; 40: 656-67.
- ³²⁷ Tsuda H, Zhang WD, Shimosato Y, Yokota J, Terada M, Sugimura T, et al. Allele loss on chromosome 16 associated with progression of human hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 6791-4.
- ³²⁸ Wijnhoven BP, de Both NJ, van der Dekken H, Tilanus HW, Dinjens WN. E-cadherin gene mutations are rare in adenocarcinomas of the esophagus. *Br J Cancer* 1999; 80: 1652-7
- ³²⁹ Kanai Y, Oda T, Tsuda H, Ochiai A, Hirohashi S. Point mutation of the E-cadherin gene in invasive lobular carcinoma of the breast. *Jpn J Cancer Res* 1994; 85: 1035-9.
- ³³⁰ Saito Y, Takazawa H, Uzawa K, Tanzawa H, Sato K. Reduced expression of E-cadherin in oral squamous cell carcinoma: relationship with DNA methylation of 5' CpG island. *Int J Oncol* 1998; 12: 293-8.

³³¹ Chang HS, Chow V, Lam KY, Wei WI, Yuen APW. Loss of E-cadherin expression resulting from promoter hypermethylation in oral tongue carcinoma and its prognostic significance. *Cancer* 2002; 94: 386-92.

³³² Nakayama S, Sasaki A, Mese H, Alcade RE, Tsuji T, Matsumura T. The e-cadherin gene is silenced by CpG methylation in human oral squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 2001; 93: 667-73.